

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«__» _____ 2020 р.

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва стимулятора росту рослин. Ділянка біосинтезу продукту»

Виконав:

студент IV курсу, групи БТ-61

Чорний Сергій Ігорович _____

Керівник:

Ас. каф. промислової біотехнології, к.т.н.

Карпенко Юрій Володимирович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу:

Доц. каф. біотехнології та біоінженерії, к.т.н. доц.

Шибєцький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

Доц. каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.н.т.

Щурська Катерина Олександрівна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному проекті немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проект	2	
2	A4	ДП 6119. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	112	
3	A1	ДП 6119. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6119. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6119. 03.000 ТК	Ферментер	1	

				ДП 6119 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Чорний С. І.			Відомість дипломного проекту	Лист	Листів
Керівн.	Карпенко Ю.В.				1	112
Консульт.	Шибєцький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проект студенту

Чорному Сергію Ігоровичу

1. Тема проекту «Технологія виробництва стимулятора росту рослин. Ділянка біосинтезу продукту», керівник проекту Карпенко Юрій Володимирович, к.т.н, ас., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проекту _____

3. Вихідні дані до проекту: штам-продуцент *Streptomyces albus* UN44; ферментер для промислового культивування - об'єм 1 м³; параметри культивування: $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, аерація, $\tau = 96$ год; кінцевий продукт – фугат культуральної рідини у бутілях для агропромисловості.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва препарату стимулятора росту рослин; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; провести аналіз методів створення високопродуктивних

промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у роботі; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю., доцент каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	18.03.20-30.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	18.03.20-06.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	18.03.20-13.04.20	
4.	Технологічна частина	13.04.20-27.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	13.04.20-27.04.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	27.04.20-11.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	11.05.20-05.06.20	
8	Подання дипломного проекту до екзаменаційної комісії	05.06.20-10.06.20	

Студент

Чорний Сергій

Керівник

Карпенко Юрій

Пояснювальна записка
до дипломного проекту
на тему: «Технологія виробництва стимулятора росту рослин. Ділянка
біосинтезу продукту»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить 112 с., 14 рис., 8 табл., 73 посилання.

Робота присвячена розробці технології виробництва препарату стимулятора росту рослин. Ділянка біосинтезу продукту.

Запропоновано в якості продуцента комплексу гідролітичних ферментів та фітогормонів для стимуляції росту рослин використовувати штам *Streptomyces albus* UN44, що володіє здатністю надпродувати цільовий продукт.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схема виробництва стимулятора росту рослин. Розраховано та вибрано найбільш ефективне обладнання для біосинтезу продукту. Наведено технологічний та конструктивний розрахунки біореактора.

Розроблена технологія повністю відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, наведено техніку безпеки та охорону праці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: СТИМУЛЯТОР РОСТУ РОСЛИН, STREPTOMYCES ALBUS, БІОСТИМУЛЯТОРИ, PGPR, PGPB.

ABSTRACT

The graduation project contains 112 pages, 14 figures, 8 tables, 73 references.

The work is devoted to the development of the technology for the production of a plant growth promoter. The site of product biosynthesis.

It has been proposed to use a strain of *Streptomyces albus* UN44, which has the ability to overproduce the target product, as a producer of a complex of hydrolytic enzymes and phytohormones to stimulate plant growth.

The technological and instrumental scheme of production of plant growth stimulator production is justified and presented in the work. The most efficient equipment for product biosynthesis has been calculated and selected. Technological and constructive calculations of the bioreactor are given.

The developed technology fully complies with the sanitary-hygienic and environmental standards, safety and labor protection are given.

KEY WORDS: *STREPTOMYCES ALBUS*, PLANT GROWTH PROMOTERS, BIOSTIMULATORS, PGPR, PGPB.

3мiCT

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1 Основні промислові продуценти.....	11
1.2 Систематичне положення	18
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	18
1.4 Культуральні ознаки	20
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	21
1.6 Поширення в природі.....	25
Висновки до розділу №1	29
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	30
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	30
2.2 Схема хімічних перетворень	37
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	42
2.4 Методи очистки цільового продукту	42
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	45
Висновки до розділу №2.....	52
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	53
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкта.....	53
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму .	58
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	62
Висновки до розділу №3.....	65
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	66
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	66
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві	67
4.3. Опис технологічного процесу	69
4.4. Матеріальний баланс.....	80

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Разроб.		Чорний С. І.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карпенко Ю.В..					7	112
						НТУУ “КПІ” ФБТ		
Керівн.		Карпенко Ю.В..						
Затверд.								

4.5 Контроль виробництва	82
4.6. Технологічна схема виробництва	85
Висновки до розділу №4	86
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	87
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	87
5.2. Технологічні, конструктивні розрахунки	90
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	101
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	101
Висновки до розділу №5	103
ВИСНОВКИ	104
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	Ошибка! Закладка не определена.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						8
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВСТУП

Розвиток сільського господарства за прискорених темпів урбанізації та індустріалізації, а також стрімкого збільшення населення Землі, яке як очікується досягне більше 9,4 млрд людей у 2050 році, є важливим фактором підтримки і забезпечення нормальної життєдіяльності людства[1].

Звичайні системи виробництва продуктів харчування мають чимало негативних впливів на навколишнє середовище[2]. Сільськогосподарські практики, що використовують занадто багато пестицидів, призводять до втрати біорізноманіття. Велика кількість добрив, що використовуються для поліпшення врожаю, не завжди повністю поглинається рослинами і може призвести до екологічної шкоди[3]. Антропогенна діяльність є причиною деградації екосистем, все більше забруднюючи повітря та воду, змінюючи клімат Землі, розмиваючи та негативно впливаючи на ґрунт, фрагментуючи та знищуючи місце проживання рослин і тварин, та виснажуючи природні ресурси[1].

Потенційна шкідливість агрохімікатів та штучних добрив для здоров'я людини і середовища, викликає необхідність розробки нових підходів к організації захисних та відновлювальних родючисть ґрунтів заходів[4]. Законодавчі зміни стосовно контролю та використання агрохімікатів, а також попит на більш стійкі, безпечні та органічні харчові продукти, диктують більш інтегрований підхід до практики управління посівами у всьому світі.

Цілісний підхід має задовольняти ефективність виробництва, економічну життєздатність, екологічну сумісність та соціальну відповідальність. З цією метою використання мікроорганізмів, що сприяють зростанню росту рослин (Plants growth promoting microorganisms - PGPM) є одним з найперспективніших методів підвищення врожайності та боротьби з хворобами в рамках комплексного управління посівами[3].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Чорний С. І.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карпенко Ю.В.						□	112
Керівн.	Карпенко Ю.В.					НТУУ “КПІ” ФБТ		
Затверд.								

Протягом останніх кількох років роль PGPM у сталому сільському господарстві та природокористуванні привертала більшу увагу, а їх використання в агроєкосистемах та вирішенні ключових екологічних проблем показали неабиякі результати. У сільськогосподарському секторі їх використання дозволило перетворити господарства з низьким врожаєм у більш стійкі системи з високим рівнем виробництва[1].

Мікроорганізми можуть вирішити декілька важливих проблем рослинництва: їх використання інгібує розвиток фітопатогенних м/о, знижує окислювальний та токсичний стрес, покращує надходження макро- та мікроелементів, що позначається на стимуляції росту і продуктивності рослин[4].

Ринок рослинних біостимуляторів зафіксує сукупний середньорічний темп приросту на 13,58% за період 2017-2022 рр. І, як оцінюється, до 2022 року складе 3,68 мільярда доларів[5]. Європа є найбільшим ринком, на який припадає близько 42% загальної частки ринку. За оцінками, ринок продажів у Європі зросте до 2,5 мільярдів доларів США до 2022 року, бо збільшення споживання органічної продукції сприяє розвитку цього ринку в регіоні[6].

Напрямок біологічних стимуляторів росту рослин є перспективним у наш час, і потребує подальшого вивчення та досліджень, як безпосередньо нових мікроорганізмів, здатних стимулювати ріст рослин, так і механізмів їх дії та взаємодії з рослинами і навколишнім середовищем. Тому, метою роботи є розробка технології виробництва препарату стимулятора росту рослин.

Для досягнення цієї мети поставлені наступні завдання: вивчити морфолого-фізіологічні та культуральні особливості продуценту, методи отримання промислових штамів; розробити оптимальну технологію виробництва препарату та підібрати необхідне обладнання, яке б задовольняло усі умови виробництва.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

На зустрічі Реєстру ЄС для рослинних біостимуляторів (РВ) та добавок для агрономічних добрив (АФА) у 2016 році було рекомендоване наступне визначення рослинного біостимулятора:

Рослинний біостимулятор - це будь-яка речовина або мікроорганізм, у тому вигляді, в якому він постачається користувачеві, застосовується до рослин, насіння або кореневого середовища з метою стимулювання природних процесів рослин, шляхом підвищення ефективності використання поживних речовин та / або толерантністю до абіотичного стресу, та / або якості врожаю, незалежно від вмісту поживних речовин або будь-якої комбінації таких речовин та / або мікроорганізмів, призначених для цього використання [7].

Всеохоплюючою групою продуцентів стимуляторів росту рослин – є мікроорганізми (Plant growth promoting microbes – PGPM), які впливають на живлення та ріст рослин за допомогою різних механізмів, включаючи фіксацію азоту, руйнування органічних речовин, солюбілізацію важкорозчинних мінералів, вивільнення хелатичних сполук та біологічно активних речовин, таких як фітогормони, вітаміни та ферменти, та підвищення ефективності кореневої системи при поглинанні поживних речовин. Вони також можуть покращити ріст рослин за рахунок виробництва біоактивних метаболітів та непрямих механізмів, таких як пригнічення фітопатогенів або індукція стійкості до збудників рослин. Численні види ґрунтових та ризосферних мікроорганізмів можуть розчиняти нерозчинні мінеральні фосфати, головним чином шляхом підкислення та виробництва органічних кислот, і таким чином мобілізувати величезні запаси фосфору (Р), які зберігаються у більшості ґрунтів і в іншому випадку недоступні рослинам [8,9].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Чорний С. І.			Характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карпенко Ю.В.					11	112
Керівн.		Карпенко Ю.В.						
Затверд.						НТУУ “КПІ” ФБТ		

PGPM мають здатність змінювати рН ґрунту та змінювати рівновагу багатьох хімічних та біохімічних реакцій, таких як осадження / розчинення, адсорбція / десорбція, комплексація / дисоціація, окислення / відновлення катіонів металів і таким чином регулюють харчування рослин. Окрім посилення живлення рослин при обмежених або дефіцитних умовах, вони також можуть зменшити згубний вплив надлишку мікроелементів, який може виникнути на кислих або забруднених ґрунтах [8,10].

PGPM можна розділити на 2 основні групи – PGPF (гриби – стимулятори росту рослин) та PGPB (бактерії стимулятори росту рослин). В свою чергу в групі PGPB особливо виділяється група - PGPR (ризобактерії стимулятори росту рослин), до складу якої вже входить група PGPA (актинобактерії стимулятори росту рослин). Обраний в даному дипломному проекті продуцент належить до групи PGPA – актиноміцетів стимуляторів росту рослин.

➤ **PGPF– гриби, стимулятори росту рослин**

Асоціації між рослинами та багатоцільовими грибами, що сприяють росту рослин (PGPF), виявились надзвичайно корисними для рослин. Показано, що гриби різнорідних класів та середовищ існування функціонують як PGPF. Добре відомі грибкові роди *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Piriformospora*, *Phoma*, *Trichoderma* - найбільш часто є стимуляторами росту рослин. Взаємодія рослина-PGPF має позитивний вплив на підземні та надземні органи рослини. Найпоширенішими ефектами є значне поліпшення проростання, енергійність розсади, виробництво біомаси, розвиток корневих волосків, ефективність фотосинтезу, цвітіння та врожайність [11]. Деякі штами мають здатність покращувати біохімічний склад рослин.

В даний час відомо, що PGPF також може контролювати численні позакореневі та кореневі збудники, запускаючи індуковану системну стійкість ISR у рослинах-господарях. Ці можливості зумовлені їхніми можливостями підвищити поглинання поживних речовин та вироблення фітогормону, а також перепрограмувати експресію генів рослин за допомогою диференціальної активації сигнальних шляхів рослин. Зростання рослин, спричинене PGPF, та

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

відповіді ISR на атаку патогенів можуть працювати в рослинах залежно від генетичного типу [11,12].

➤ **PGPR - ризобактерії стимулятори росту рослин**

Одним з потенційних способів зниження негативного впливу на навколишнє середовище в результаті постійного використання хімічних добрив є інокуляція ризобактерій, що стимулюють зростання рослин (PGPR). Ці бактерії сприяють росту і розвитку рослин, і багато різних родів були комерціалізовані для використання в сільському господарстві.

Оскільки основні поживні речовини рослинами витягуються з ґрунту корінням, хороший ріст коренів вважається передумовою для прискореного розвитку рослин. Багато систем PGPR викликають стимуляцію росту коренів, іноді за допомогою продукції фітогормонів рослиною або бактеріями [13,14].

➤ **PGPA – актиноміцети стимулятори росту рослин**

Незважаючи на те, що потенціал актинобактерій у виробництві антибіотиків досить добре вивчений, їх здатність сприяти росту рослин вивчена не повністю. Актинобактерії (PGPA) можна розглядати як більш перспективну таксономічну групу бактерій PGP, через:

- ✓ велику кількість актинобактерій на грам ґрунту та їх ниткоподібну природу;
- ✓ геном, відповідальний за виробництво вторинних метаболітів (~ 5 до 10%) помітно більше, ніж у інших бактерій;
- ✓ кількість родів, що сприяють росту рослин, в 1,3 рази більше в актинобактерій, ніж у інших бактерій.

Актинобактерії - це грампозитивні, аероби, факультативні анаероби або анаероби. Більшість є хемоорганотрофами і мають жорстку клітинну стінку, що містить мурамідні кислоти або тейхоеві кислоти. Поширеним є зростання при нейтральному рН та температурі навколишнього середовища, але також зустрічаються - ацидофіли, алкалофіли або галофіли чи термофіли. Більшість є сапрофітними, але декілька є патогенними для рослин і тварин.

Генетичний потенціал робить актинобактерії потужними виробниками вторинних метаболітів з великим спектром різних біологічних видів діяльності, застосовних до сільського господарства та промисловості [15].

PGPA, виявлені з ризосферних місць існування, включають *Streptomyces*, *Thermobifida*, *Microbispora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardia* та *Kitasatospora* [16].

Штами з *Streptomyces rochei* та *Streptomyces thermolilacinus*, які були виділені з ризосфери пшениці, показали високу активність PGP та виробництво ґрунтових ферментів, що призвело до збільшення на 12,2–24,5% довжини врожаю та 1,8–2,3 раза в біомасі пшениці [17].

Ризосферні та ґрунтові актинобактерії виробляють різні фітогормони. Вони також можуть регулювати рівень вироблення фітогормонів у рослинах. Поточна інформація про актинобактеріальні фітогормони та їх вплив на рослини узагальнена в таблиці 1.1.1.

Існує ряд прикладів регуляції фітогормонів PGPA. Збільшення доступності регуляторів росту, вироблених шляхом використання *Streptomyces* spp. покращує ріст томатів. *Streptomyces olivaceoviridis* і *Streptomyces rochei* виробляють значну кількість регулюючих ріст речовин, включаючи ауксини, гібереліни та цитокініни, які відповідно збільшують довжину пагона та відтворюють свіжу масу [15].

Актинобактерії виробляють сидерофори для полегшення засвоєння заліза шляхом зв'язування з Fe^{3+} з навколишнього середовища. Сидерофори мають різні хімічні структури і утворюють сімейство щонайменше 500 різних сполук. До найбільш поширених структурних груп належать катехоли.

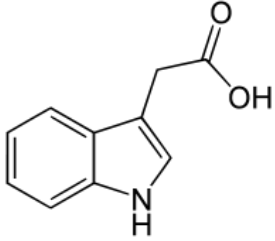
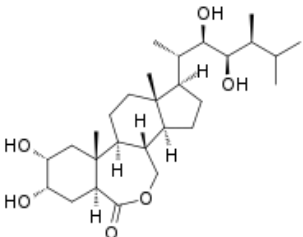
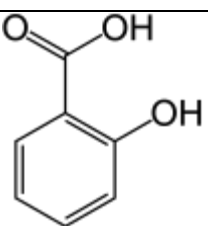
Антагонізм PGPA проти фітопатогенів

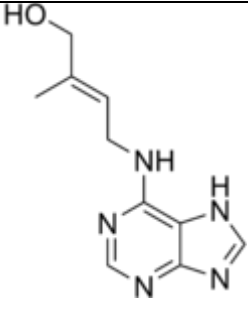
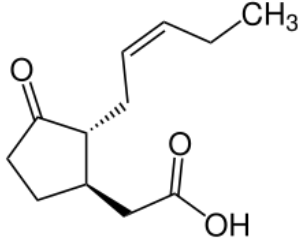
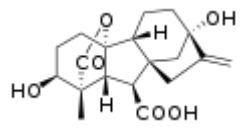
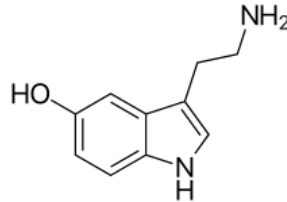
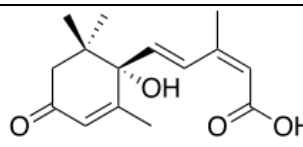
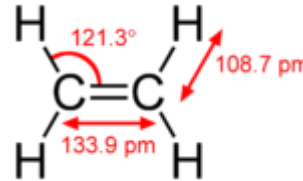
Фітопатогени можна віднести до основних та незначних патогенів, які вбивають або пригнічують ріст господарів відповідно. Актинобактерії, не тільки опосередковано підтримують свою рослину-господаря, вони також можуть безпосередньо антагонізувати фітопатогени як засоби біоконтролю. Актинобактерії мають високу здатність виробляти антимікробні агенти, сидерофори, гідролітичні або детоксикуючі ферменти, і тому можуть

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

безпосередньо антагонізувати фітопатогени. Крім того, вони можуть опосередковано справлятися з фітопатогенами, підтримуючи ріст рослин-господарів, конкуруючи з фітопатогенами за отримання заліза, поживних речовин, мінералів та місця колонізації. Ці властивості особливо корисні для незначних патогенів, які знижують ріст рослин без явних симптомів. Симбіотичні актинобактерії пригнічують ріст незначних фітопатогенів [15].

Табл. 1.1.1 Метаболіти фітогормонів, що утворюються або модулюються рослинними симбіотичними актинобактеріями [15]

Гормон	Структура	Функція для рослин	Актинобактерія продуцент
Гетероауксин (β -індолоцтова кислота)		Стимулює проростання насіння та бульб, ініціює бічне утворення коренів; впливає на біосинтез метаболітів	<i>Micromonospora</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Frankia</i>
Брасінолід (Brassinolide)		Підвищує вміст хлорофілу, стимулює синтез білка, активує певні ферменти та регулює клітинну диференціацію	<i>Streptomyces</i>
Саліцилова кислота		Викликає структурно-активні відносини, продовжує життя квітів, гальмує біосинтез етилену та полегшує запилення	<i>Streptomyces</i>

Цитокініни		Ключова роль у морфології рослин, старінні листя та взаємозв'язках, ключовий регулятор захисту рослин	<i>Micromonospora</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Actinoplanes</i>
Жасмінова кислота (рослинний гормон класу жасмонатів)		Індукована системна стійкість проти некротрофів, активізує бульбоутворення, дозрівання плодів та утворення пігментів	<i>Streptomyces</i>
Гібереліни		Стимулюють подовження стебла, стимулюючи поділ і подовження клітин. Стимулює цвітіння	<i>Micromonospora</i> , <i>Frankia</i> , <i>Actinoplanes</i>
Серотонін (5-hydroxytryptamine)		Структурний аналог ауксинів. Рослина метаболізує серотонін до гетероауксину	<i>Streptomyces</i>
Абсцизова кислота		Прискорює закриття прокладок і старіння	<i>Streptomyces</i>
Етилен		Порушує геотропізм, прискорює дозрівання та старіння плодів	*

* Актинобактерії можуть стимулювати його деградацію

Як видно з даної таблиці 1.1.1 *Streptomyces* є найбільш продуктивним родом актинобактерій з точки зору утворення вторинних метаболітів.

Біотехнологічне застосування PGPS (Стреміцетів стимуляторів росту рослин)в сільському господарстві

Використання бактерій, які сприяють зростанню рослин, для поліпшення доступності поживних речовин для рослин є важливою практикою сталого сільського господарства і є альтернативою хімічним пестицидів і добрив. PGPS може підвищити доступність поживних речовин для рослин за рахунок біосинтезу хелаторів металів і солюбілізації фосфору, виробляючи фітогормони, контролюючи фітопатогени і зменшуючи абіотичний стрес.

Вид - *Streptomyces albus*, який на даний час є доволі добре вивченим і може бути віднесений до стимуляторів росту рослин.

Специфічна активність препаратів *Streptomyces albus* перевірена [18] у біорегуляції росту і розвитку рослин огірка, за результатами якої підтверджено стимулювання росту кореня і стебла огірка після обробки насіння розчином у концентрації 15-22 од/мл (1-1,5%). Через 5 діб росту оброблене препаратом насіння у концентраціях 0,1 та 1,0% відрізнялося від контролю в межах 5-20%, як візуально, так і за морфометричними показниками. Також показано здатність біопрепаратів *S.albus* UN44 впливати на вміст проліну в рослині огірка, а отже на її стресостійкість [18].

При дослідженні стимулюючої дії комплексних лізоензимних препаратів ГЗх і Г10х з *Streptomyces albus* було також відтверджено ростостимулюючу дію на рослинах фасолі [19], ярового рапсу [20], кабачку, огірку, томаті, редисі [21], кукурудзи, ячменя, овса, пшениці та гороху [22]. Ще одне дослідження демонструє стимуляцію росту рослин кукурудзи в результаті попереднього замочування і проростання насінин у рідкій формі препарату з *Streptomyces albus* [23].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

Отже, видно що вид *Streptomyces albus* на даний час є доволі широко дослідженим і гарно проявив себе у стимуляції росту багатьох поширених сільхозрослин, тому розробка препарату на його основі і практичне використання є актуальним.

1.2 Систематичне положення

За показником Берджі *Streptomyces albus* відноситься до групи 25 «Стрептоміцети та близькі роди» [24] :

домен : *Procaryota*

царство: *Бактерії (Bacteria)*

тип : *Актинобактерії (Actinobacteria)*

клас: *Актинобактерії (Actinobacteria)*

ряд: Актиномицети *Actinomycetales*

родина: *Streptomycetaceae*

рід: *Streptomyces*

вид: *Streptomyces albus*, штаму UN44.

Streptomyces albus UN 44 - продуцент комплексу літичних ферментів, депонованим в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під реєстраційним номером *Streptomyces albus* IMB Ac-5030 [25].

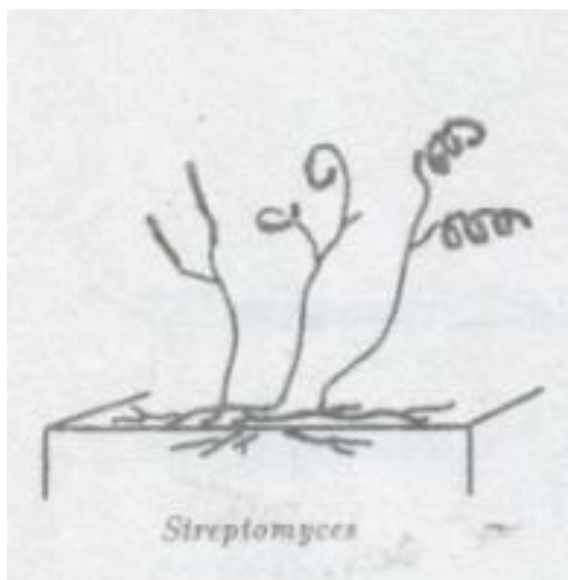
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Веgetативні гіфи (діаметром 0,5-2,0 мкм) утворюють сильно розгалужений несептований міцелій, що рідко розпадається на фрагменти. Повітряний міцелій в зрілому стані несе ланцюжки з трьох чи більше спор. Для декількох видів характерні короткі ланцюжки спор на субстратному міцелії. Спори нерухомі. Колонії відокремлені і лишайникоподібні, шкірянисті чи масляні; поверхня на початку відносно гладка, але далі формується переплетіння повітряного міцелію, який може бути пластівцевого, зернистого, порошкоподібного чи оксамитового типу [24].

Колонії покриває повітряний міцелій – вільні гіфи, що мають гідрофобну оболонку і ростуть вертикально вверх від поверхні колонії. Ці гіфи спочатку не

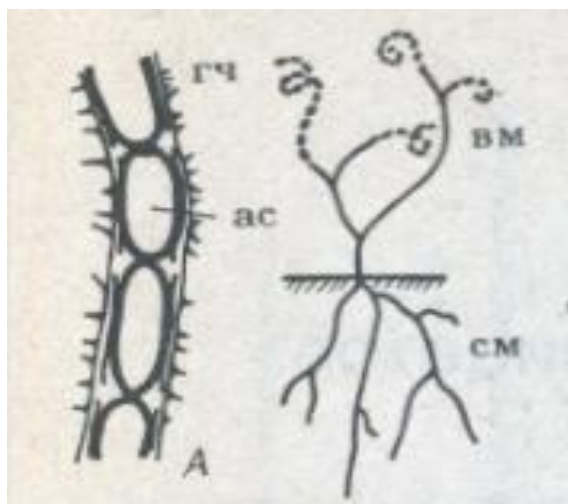
					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

забарвлені, але коли починається дозрівання спор, вони набувають різноманітне забарвлення. На цій стадії колонії стрептоміцетів стають порошковидними чи бархастими і її легко відрізнити від типових бактеріальних колоній.



Утворюють різноманітні пігменти, що визначають колір субстратного і повітряного міцелія. Можуть синтезувати пігменти, що дифундують у середовище. Продукують антибіотики. Грампозитивні, але не кислото- чи спиртостійкі.

Рис. 1.3.1 Морфологія повітряного та субстратного міцелія *Streptomyces* [24].



Для видів *Streptomyces* характерні ланцюжки спор на повітряному міцелії(ВМ); на субстратному міцелії(СМ) спори, як правило, відсутні. Спори на повітряному міцелії називаються артроспорами (АС) і представляють собою правильні сегменти гіф з товстою споровою оболонкою, покриті гідрофобним чохлам (ГЧ), який може мати вирости в вигляді шипів чи волосків.

Рис. 1.3.2 Розташування спор характерне для видів *Streptomyces* [24].

У *Streptomyces* - довгі ланцюжки конідій. Ентероталоспори — це ентероталічні конідії, що формуються з передіснуючої ділянки гіфи синхронно. Спори дозрівають ланцюжком, у чохлі, що утворюється зовнішнім шаром клітинної стінки. Даний спосіб конідіогенезу розповсюджений серед актиноміцетів *Streptomyces* [26].

По числу спор є поліспоровими. Спороутворення переважно екзогенне. Спорангії складаються з прямих чи закручених спірально нерухомих спор.

У *Streptomyces* спори утворюються в 2 етапи:

- Апікальна ділянка повітряної гіфи відділяється септою, нуклеоїд витягується.
- Майже одночасно клітина ділиться септами на ділянки, нуклеоїд ділиться в тих же місцях, клітинна стінка стає в 2 рази товще, спори округляються і їх стінка стає в 7 разів товще стінки гіфи.

1.4 Культуральні ознаки

Табл. 1.4.1 Морфологія органів плодоношення штаму *Streptomyces albus* UN 44 при вирощуванні на різних середовищах [25].

Середовище культивування	Характер росту	Повітряні міцелії	Субстратні міцелії	Форма спороносців	Форма спор та спосіб утворення
Агар Чапека	Задовільний	Блідо-білий	Безбарвний	Прямі чи трохи хвилясті	Овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Вівсяний агар	Дуже добрий	Білий	Безбарвний	Прямі чи трохи хвилясті	Овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Мінеральний агар Гаузе	Добрий	Білий	Безбарвний	Прямі чи трохи хвилясті	Овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Органічний агар Гаузе	Дуже добрий	Білий до кремового	Безбарвний	Прямі чи трохи хвилясті	Овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

Глюкозо-аспарагіновий агар	Задовільний	Світло-сірий з жовтуватим	Безбарвний	Прямі чи трохи хвилясті	Овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Сусло-агар	добрий	Світло-кавовий	Безбарвний	Прямі чи трохи хвилясті	Овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

Наприкінці вирощування в середовищі утворюється непрозора густа міцеліальна маса жовтувато-оливкового кольору з легким запахом дусту. Клітини штаму формуються у вигляді гіф діаметром 0,7-0,9 мкм.

Спороносці короткі трохи хвилясті, мало розгалужені. За рахунок фрагментації утворюються гладкі, овальні спори. Забарвлення повітряного міцелію коливається від білого до світлокавового, субстратний міцелій майже безбарвний. Добре розвинутий повітряний міцелій утворюється на більшості середовищ, що вказані у таблиці [25].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Загальні екофізіологічні риси роду *Streptomyces* підтримують концепцію космополітичної біогеографічної поведінки. Особливості включають здатність утворювати спори в несприятливих абіотичних умовах, конкурентну здатність, пов'язану з виробленням антибіотиків, широкий діапазон рН, сприятливий для росту. Стрептоміцети, як правило, є хемоорганотрофними з великою універсальністю для метаболізації широкого спектру джерел вуглецю, включаючи моно- та дизахариди, органічні кислоти (глюкоза, декстроза, фруктоза, лактоза, мальтоза, маніт, рамноза, сахароза, гліцерин та гліколева кислота), полісахариди (включаючи целюлозу та крохмаль), а також більш складні джерела С (гумінова та фульвова кислоти).

Стрептоміцети мають помітно іншу структуру клітинної оболонки, ніж грамнегативні бактерії, так що рід *Streptomyces* був ідентифікований за допомогою складу клітинної стінки. Як і інші актинобактерії, стрептоміцети не

мають зовнішньої мембрани, а їх клітинні стінки мають товстий пептидоглікановий шар. Наявність LL-діамінопімеліну (LL-DAP) у клітинній стінці надає типову хемотаксономічну характеристику для всіх представників роду *Streptomyces*, а його присутність разом із гліцином характеризує клітинну стінку як тип I. Тейхоеві кислоти (аніонні глікополімери) є ще одним важливий компонент клітинної стінки, який надає негативний заряд клітинній поверхні та сприяє фізіологічному функціонуванню та коагрегації клітин. Не містить міколових кислот, але в великих кількостях містить насичені жирні кислоти ізо- та антеізової будови; основні ізопреноїдні зв'язки – гекса чи октагідровані менахіони с 9 ізопреновими одиницями. В складі складних полярних ліпідів зазвичай присутні фосфатидигліцерол, фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол та фосфатидилінозитолманозид.

Хемоорганотрофи; метаболізм окислювального типу. Каталазопозитивні; як правило, відновлюють нітрат до нітриту; розкладають аденін, ескулін, казеїн, желатин, гіпоксантин, крохмаль та L-тирозин. В якості єдиних джерел вуглецю та енергії для росту використовують різноманітні органічні речовини. Оптимальна температура 25-35 °C; оптимальний для росту діапазон pH 6.5-8.0. По відношенню до кисню - аероби.

Вирощування відбувається за температури 28 ± 1 °C та перемішуванні при швидкості 220 об/хв., впродовж 48-72 годин на рідкому середовищі Чапека або іншому середовищі. Оптимальне pH середовища становить $6,5 \pm 1$.

Для короткострокового зберігання (до 2-х місяців) штам *Streptomyces albus* UN 44 підтримується на середовищі Чапека або органічному агарі Гаузе за температури 4 °C. Довготривале зберігання можливе у вигляді ліофілізованої спорової суспензії, запаяної у ампулах при температурі 4 °C. Під час висушування захисним середовищем виступає глюкоза.

На 3-4 добу там *Streptomyces albus* UN 44 продукує комплекс літичних ферментів - Цитал, з широким спектром бактеріолітичної активності щодо грампозитивних та частини грамнегативних мікроорганізмів. Комплекс володіє термостійкістю в межах 60-65 °C, виявляє активність в діапазоні 37-60 °C. До

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

складу ферментного комплексу входять - протеїнази, пептидази, мурамідази та ацетил глюкозамінідази.

Інші фізіолого – біохімічні ознаки штаму *Streptomyces albus* UN 44 наведені у таблиці 1.5.1:

Табл. 1.5.1 Фізіолого-біохімічні ознаки штаму *Streptomyces albus* UN 44 [25].

Показник	Результат спостереження
Утилізація джерела вуглецю	<p>✓ Добре росте на: глюкозі, галактозі, фруктозі, ксилозі, арабінозі, мальтозі, маніті</p> <p>✓ Слабо росте на: лактозі, дульциті, інозиті, сахарозі, рамнозі</p> <p>✓ Не росте на: сорбіті</p>
Створодження молока	Створоджує
Розрідження желатину	Розріджує добре
Відновлення нітратів	Відновлює до нітритів
Тирозиназна активність	Не виявляє

Життєвий цикл починається тоді, коли сприятливі умови навколишнього середовища та наявність поживних речовин сприяють проростанню спор (рис. 1.5.1). Далі, зародкові трубки виростають, утворюючи синцитіальний вегетативний або субстратний міцелій, який складається із взаємопов'язаних живих гіф, які відповідають за поглинання поживних речовин. Коли настає дефіцит поживних речовин або виникає інший стресовий стан, запрограмована загибель клітин міцелії субстрату та диференціювання клітин у центрі колонії призводять до формування повітряних гіф. Ці повітряні гіфи покриті волокнистим гідрофобним шаром, можливо, щоб легше розбитати поверхневий натяг повітряних кишень в ґрунті, тоді як гіфи, що живляться, мають гладку гідрофільну поверхню.

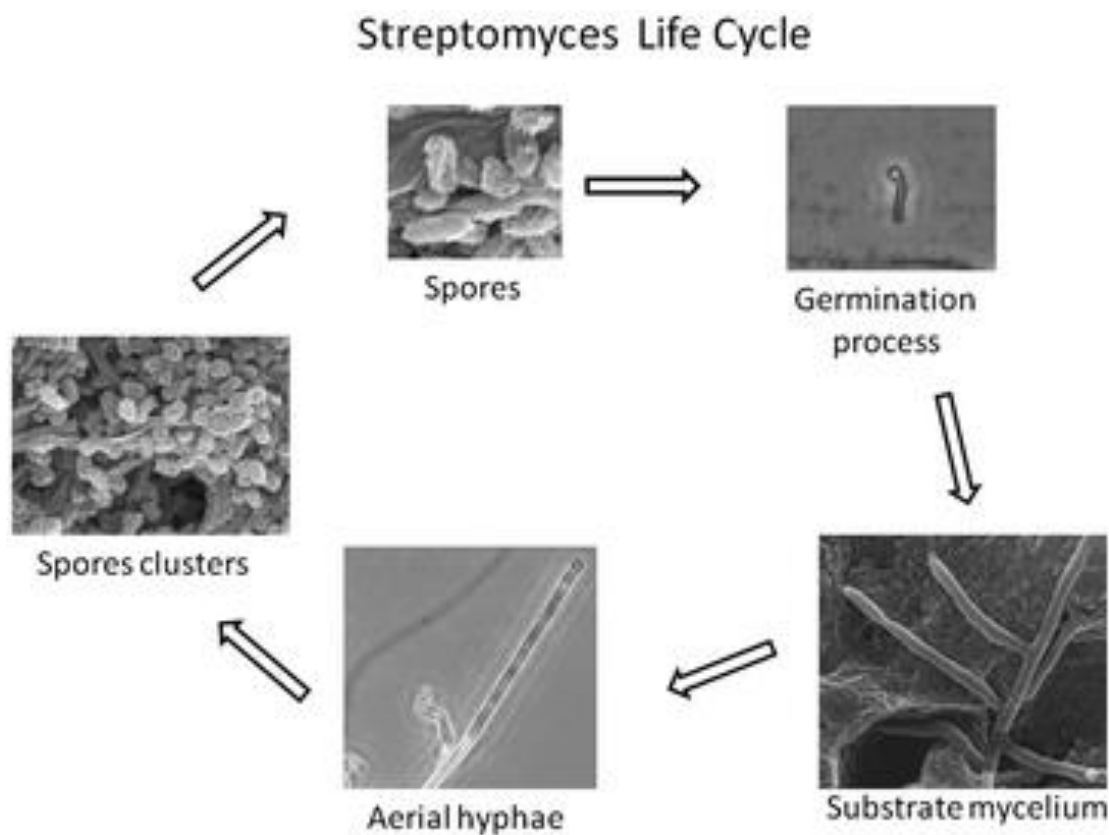


Рис. 1.5.1 Життєвий цикл *Streptomyces* [2]

Зростання *Streptomyces* передбачає розширення кінчиків гіфа та супікальне розгалуження. На відміну від процесу в паличкоподібних бактеріях, де цитокінез базується на побудові поперечної стінки шляхом осадження муреїну в бічні стінки, ріст *Streptomyces* відбувається шляхом формування гіфів на полюсі клітини. Хоча це не чітко з'ясовано, ця структура росту клітин регулюється апікальним білковим комплексом DivIVA. У *Bacillus subtilis* DivIVA взаємодіє із системою Min для координації поділу в середині клітини. Навпаки, у *Streptomyces*, система Min відсутня, тому DivIVA впливає на поділ на кінчику клітини. Інший аспект росту стрептоміцетів включає збереження двох груп білків, гомолога тубуліну FtsZ та кількох мембранних білків, які обоє асоційовані з цитокінетичним Z-кілцем та пептидогліканом септалу.

Остання фаза життєвого циклу *Streptomyces* складається з апікальних клітин повітряних гіф, що диференціюються у споровий ланцюг. Диференціюючий верхівковий відділ зростає за рахунок розширення наконечника і починає синхронний, множинний поділ клітин у контрольовану

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

розвитком форм. Знову ж таки, відбувається участь гомолога тубуліна FtsZ, що призводить до спороношення перегородки, а потім ці спори збирають товсті спорові стінки, осаджуючи актин. Розмір спор *Streptomyces* може становити від 0,7 до 1,2 мкм. Ці останні дві фази життєвого циклу *Streptomyces* тісно пов'язані з виробленням антибіотиків. Під час запрограмованої клітинної загибелі субцетової міцелії одночасно виробляються антибіотики, можливо для захисту джерел поживних речовин від конкуруючих мікроорганізмів [2].

1.6 Поширення в природі

Представники роду *Streptomyces* добре визнані бактеріями, що живуть в ґрунті. Тим не менш, багато досліджень показали, що вони широко поширені як у водному, так і в наземному середовищі. Цей космополітичний розподіл стрептоміцетів можна пояснити виробництвом спор, які легко розповсюджуються і, таким чином, можуть сприяти його наявності в різних середовищах як видно з таблиці 1.7.1. Кілька представників роду *Streptomyces* були виділені з різних рослинних та репродуктивних частин рослин, таких як коріння, бульби, стебла, листя і насіння [2].

Екологія взаємодії *Streptomyces* - рослина-господар

Для кращого розуміння взаємодії між стрептоміцесами, які сприяють зростанню рослин (PGPS), і їх господарями, необхідно з'ясувати ті біохімічні механізми, які призводять до спільних взаємозв'язків. Більшість стрептоміцетів є бактеріями, що живуть в ґрунті, з вільним життєвим циклом, і здатні ефективно колонізувати ризосферні ділянки. Зрештою, деякі PGPS можуть стати ендofітними і колонізувати внутрішні тканини рослини-господаря і частково або повністю провести свій життєвий цикл всередині них. Тому, перш ніж обговорювати реакції рослин на PGPS, необхідно описати процес колонізації ризосфери.

Ризосфера - це ґрунт, що знаходиться під впливом корневих ексудатів, секретів і пухкості коренів рослин. Ризоплан грає вирішальну модулюючу роль в структурі мікробної спільноти і мікробного різноманіття, що в кінцевому підсумку впливає на ріст рослин. Крім того, на мікробну активність в ґрунті

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

ризосфери помітно впливають вуглеводовмісними метаболіти, що виділяються з коріння і складаються з численних з'єднань, таких як іонні секрети, вільний кисень і вода, ферменти, білки, амінокислоти, органічні кислоти, цукри і фенольні кислоти. Ці сполуки діють як харчові ресурси, хіміотриктанти, хеморепульсанти і сигнальні сполуки, які формують структуру і активність мікробної спільноти різних груп мікроорганізмів і роблять значний вплив на взаємодію коренів і мікроорганізмів рослин.

Визнано, що PGPS є хорошими колонізаторами ризосфери. Спочатку клітини стрептоміцетів, що переносяться в ґрунт, реагують на виділені сполуки, і активно залучаються до ризосфери хіміотаксисом. Здатність виробляти антибіотики та інші біоактивні сполуки, надають екологічну перевагу в конкуренції і дозволяють PGPS колонізувати ніші.

Табл. 1.7.1 Поширення бактерій виду *Streptomyces* [2].

Вид	Ізольований з	Основні характеристики
<i>S. coelicolor</i>	Ґрунт	Найкращий генетично відомий представник роду
<i>S. axinellae</i>	Середземноморська губка <i>Axinella polypoides</i> (Porifera)	Не описано
<i>S. griseus</i>	Ґрунт	Продуцент антибіотику стрептоміцину
<i>S. chumphonensis</i>	Морські відкладення	Не описано
<i>S. rochei</i>	Розклавшийся коров'ячий гній	Змімає стресс спричинений <i>Sc. sclerotiorum</i>
<i>S. fildesensis</i>	Антарктичний ґрунт	Не описано

Вид	Ізольований з	Основні характеристики
<i>S. scabies</i>	Картопляна парша	Збудник парші картоплі
<i>S. pseudovenezuelae</i>	Ризосфера <i>Ebenus sibthorpii</i>	Антагоністична активність проти <i>Rhizoctonia solani</i>
<i>S. oryzae</i>	Поверхневі стебла рису	Не описано
<i>S. wadayamensis</i>	Рослинна тканина <i>Citrus reticulata</i>	Антагоністична активність проти <i>Xylella fastidiosa</i>
<i>S. kebangsaanensis</i>	Внутрішня тканина <i>Portulaca oleracea</i> L. Stems	Виробник феназин-1-карбонової кислоти
<i>S. diastaticus</i>	Вермікомпост жмиху соняшника	Стрептоміцет, що сприяє росту рослин. Продуцент каталази
<i>S. variabilis</i>	Вермікомпост жмиху соняшника	Солубілізатор фосфату

Лише меншість видів визнаються фітопатогенними агентами; а саме: *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* і *S. ipomoeae*, які є усіма етіологічними збудниками поширених захворювань парші. *Streptomyces scabies* є модельним організмом для дослідження взаємодії рослин збудника з грампозитивними бактеріями, в яких система секреції білка важлива для його патогенезу.

На відміну від цього, більшість видів *Streptomyces* встановлює корисну взаємодію рослина-мікроорганізм. Повідомлялося про здатність деяких видів *Streptomyces* отримувати доступ до корневих тканин і встановлювати ендоефітний спосіб життя, не завдаючи видимої шкоди або симптомів рослині

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

господарю. Ці види можна знайти переважно в апопластичній відділенні, що містять міжклітинний простір і просвіт диференційованих мертвих клітин (склеренхіми і клітин ксилеми) органів рослини-господаря (коріння, стебла, листя, квіти, плоди і насіння) внутрішньоклітинні випадки зустрічаються рідше.

На відміну від грамнегативних бактерій, стрептоміцети і інші нитчасті актинобактерії мають активні структури проникнення, які ростуть на поверхні рослини і інфікують інтактні клітини. *Streptomyces* може потрапляти в рослинні тканини природними отворами, такими як устільні отвори, сочевиця, гідтоди, рани, розбиті трихоми і кореневі тріщини, утворені бічними зонами появи коренів. Рослини проявляють захисні реакції під час зараження PGPS, але вони менш агресивні, ніж ті, що виражені при патогенних взаємодіях.

Ендофітна колонізація, як правило, є важливою екологічною перевагою мікроорганізму, оскільки захищене середовище менш сприйнятливим до абіотичного стресу (рН, окислювальний стан, осмотичні та гідравлічні зміни) і мікробної конкуренції в порівнянні з системою ризосфера - ґрунт. Крім того, інтимний контакт між клітинами рослини-господаря і мікробними клітинами може бути більш ефективним для двонаправленого обміну сигналами, функціональними метаболітами і джерелами живлення для успішної корисної взаємодії, може сприяти зростанню рослини-господаря.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

Висновки до розділу №1

- Генетичний потенціал робить актинобактерії потужними виробниками вторинних метаболітів з великим спектром різних біологічних видів діяльності, застосовних до сільського господарства та промисловості;
- Рід *Streptomyces* є найбільш продуктивним родом актинобактерій з точки зору утворення вторинних метаболітів, особливо фітогормонів.
- Штам *Streptomyces albus* UN 44 на 3-4 добу продукує комплекс літичних ферментів з широким спектром бактеріолітичної активності щодо грампозитивних та частини грамнегативних мікроорганізмів. До складу ферментного комплексу входять ферменти різної специфічності - протеїнази, пептидази, мурамідази, ацетил глюкозамінідази, С-хітанази.
- Загальні екофізіологічні риси роду *Streptomyces* підтримують концепцію космополітичної біогеографічної поведінки. Є хемоорганотрофними з великою універсальністю для метаболізації широкого спектру джерел вуглецю
- Більшість видів *Streptomyces* встановлює корисну взаємодію рослина-мікроорганізм.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Фітогормони

Фітогормони або регулятори росту рослин являють собою органічні речовини, які при низьких концентраціях (<1 мМ) сприяють, інгібують або модифікують зростання і розвиток рослин. Загальні групи фітогормонів включають в себе гібереліни, цитокініни, абсцизову кислоту, етилен, брасиностероїди і ауксини [27].

Вид *Streptomyces albus* є продуцентом ауксинів та гіберелінів [18], та скоріше всього абсцизової кислоти і цитокінінів, дані про синтез яких є у багатьох представників роду *Streptomyces* [28-30].

Фітогормони формують рослини, впливаючи на зростання насіння, час цвітіння, старіння листя і плодів. Вони також впливають на експресію генів і рівні транскрипції, клітинне ділення і зростання. У клітинах-мішенях фітогормони регулюють клітинні процеси, формування патернів, вегетативний і репродуктивний розвиток і стресові реакції. Таким чином, всі основні види діяльності, такі як утворення листя, квітів, розвиток і дозрівання плодів, регулюються і визначаються гормонами. Ризосферні мікроорганізми можуть також продукувати або модулювати фітогормони в умовах *in vitro*. Таким чином, багато RGPB можуть змінювати рівень фітогормонів і тим самим впливати на гормональний баланс рослини і її реакцію на стрес [27,31].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Чорний С. І.				БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		Літ.	Арк.
Перевір.	Карпенко Ю.В.							Аркушів
							79	112
Керівн.	Карпенко Ю.В.						НТУУ “КПІ” ФБТ	
Затверд.								

Ауксини (індол-3-оцтова кислота / індолоцтова кислота / IAA)

Найбільш поширеним механізмом, пояснення позитивного впливу RGPB на ріст рослин, є їх здатність продукувати ауксин. Досить багато відомих ауксинов зустрічаються в природі, і індол-3-оцтова кислота (IAA) виділяється як найбільш значуща. Фактично в усій літературі ауксин часто є взаємозамінним з IAA. Іншими подібними сполуками, які, як повідомлялося, мають ауксинову активність, деякі з яких активно беруть участь в анаболізмі IAA, є індол-3-ацетамід, індол-3-піруват і індол-3-ацетальдегід, показані на рис. 2.1.1

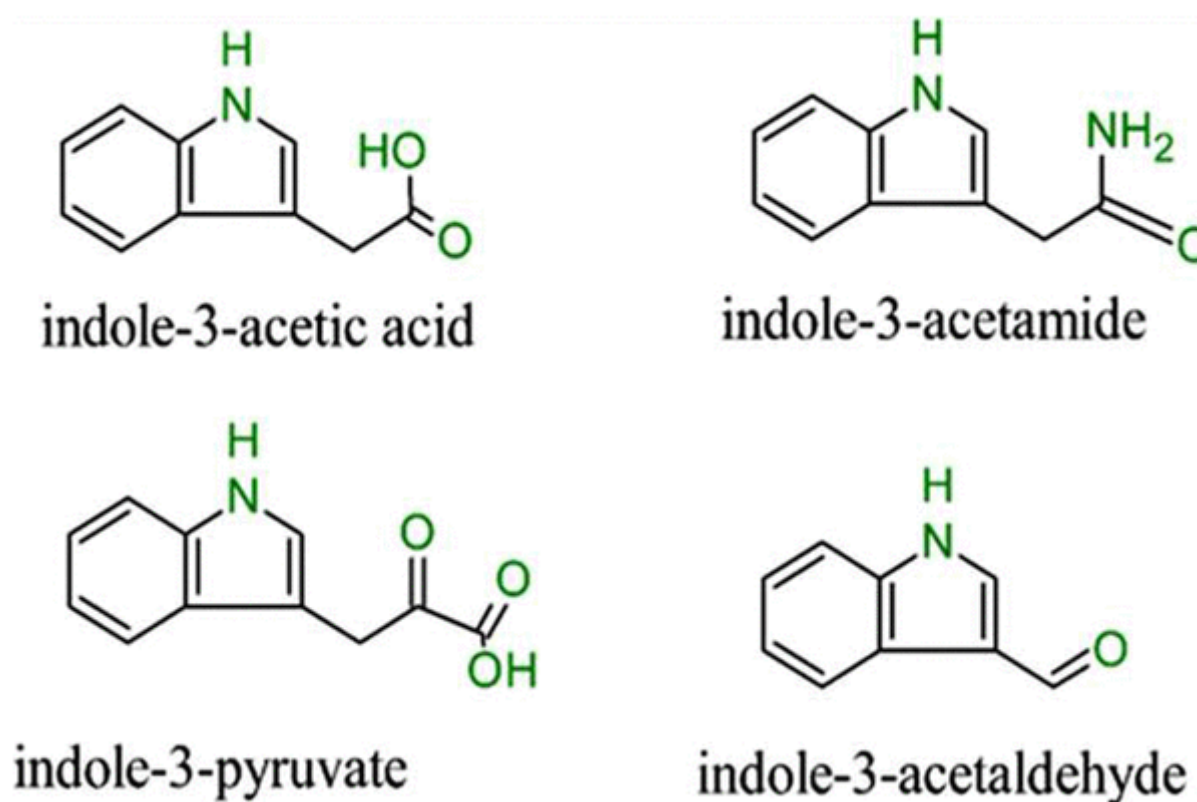


Рис. 2.1.1 Структурні формули відомих похідних IAA [32].

Цитокиніни

Цитокиніни - це фітогормони, які сприяють поділу клітин в коренях і пагонах рослин. Їх основна функція - зростання і диференціювання клітин.

Цитокиніни контролюють диференціювання клітин в меристематичних тканинах рослин. У рослинах цитокиніни в основному синтезуються в коренях, хоча вони розподілені по всій рослині. Існують дві групи цитокинінів, засновані

на їх структурі: тип аденіну і тип фенілсечовини. Тип аденіна включає кінетин, бензиладенін і зеатин, в той час як тип фенілсечовини включає дифенілсечовину і тидіазурон (рис. 2.1.2). Цитокиніни регулюють апікальне домінування, поділ клітин, подовження коренів, проростання насіння, диференціювання ксилеми і хлоропластів, розвиток квітів і фруктів, передачу поживних сигналів, старіння листя і взаємодії рослин і патогенів. На баланс цитокинінів впливають рівні інших регуляторів росту, наприклад, ауксини, а також сигнали навколишнього середовища [32,33].

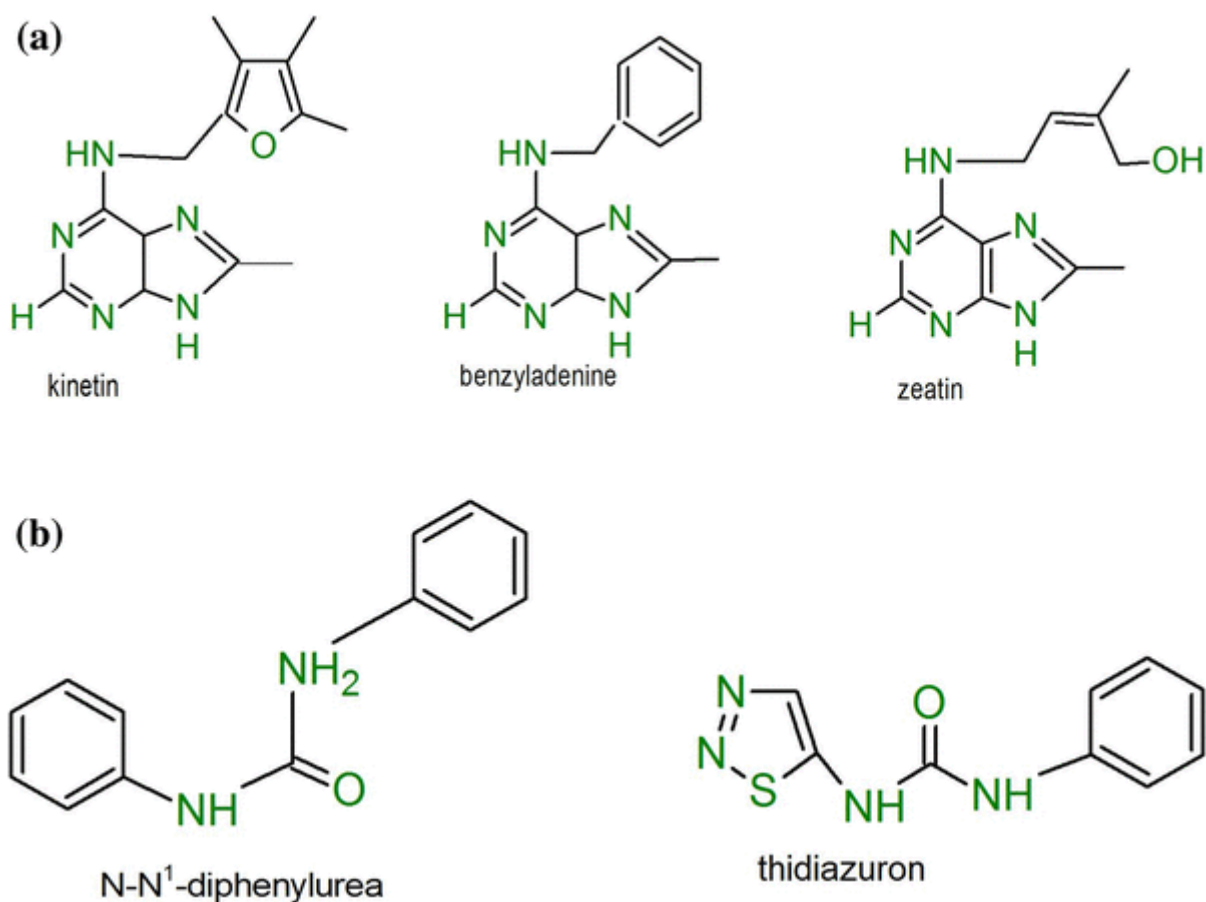


Рис. 2.1.2 (а) - похідні аденіну цитокиніни, (б) цитокиніни типу дифенілсечовина [32].

Гібереліни

Гібереліни - хімічні речовини, які виробляються рослинами природним шляхом і беруть участь в декількох аспектах проростання. Вони стимулюють ферменти (альфа-амілазу) і допомагають в гідролізі крохмалю, присутнього в насінні, в глюкозу для використання в клітинному диханні. Гібереліни - це гормони рослин, які впливають і контролюють процеси розвитку рослин, такі як подовження стебла, проростання, спокій, цвітіння, статевая експресія і старіння листя і плодів [32]. Гібереліни діють як хімічний посередник і допомагають, порушуючи стан спокою. Багато ґрунтових бактерії в цілому і RGPB зокрема можуть продукувати цитокиніни або гібереліни, або обидва разом [27].

Гібереліни включають велику групу тетрациклічних дитерпеноїдних карбонових кислот, що мають вуглецеві скелети C 20 або C 19. 136 структур гібереліну були ідентифіковані і представлені як GA 1 -GA 136. Тільки 4 GA були ідентифіковані в бактеріях; GA 1, GA 3, GA 4 і GA 20, причому GA 1 і GA 4 є найбільш активними. Гібереліни відомі стимуляцією росту і активацією важливих процесів росту, включаючи подовження стебла, проростання насіння, цвітіння, підвищення швидкості фотосинтезу і вмісту хлорофілу. Однак, незважаючи на величезну кількість різних гіберелінів, біологічна активність і роль молекул гібереліну в значній мірі невідомі. GA 1, GA 3, GA 4 і GA 7 (рис. 2.1.3), залишаються переважно відомими біологічно активними формами [32].

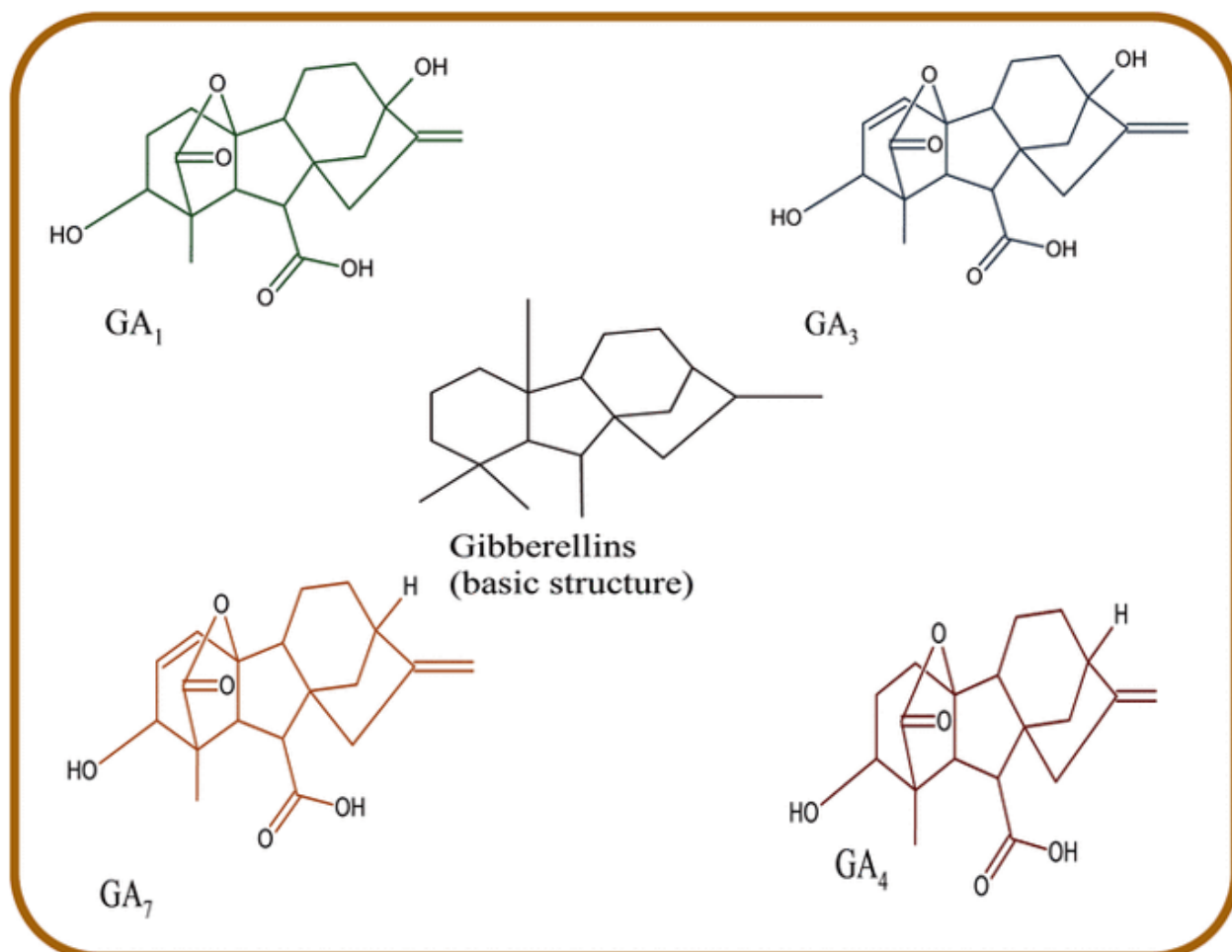


Рис. 2.1.2 Хімічна структура гіберелінів [32].

Біохімія гіберелінів в бактеріях схожа з біохімією гіберелінів у рослин з деякими невеликими відмінностями. Гібереліни можуть викликати ріст і розвиток пагонів, а також пригнічувати ріст коренів за допомогою дії сигнальної системи гібереліну, репресора DELLA, який активує індукуючий гіберелін гени [32].

Антибіотики

Антибіотики - це гетерогенна група низькомолекулярних органічних сполук, що виробляються бактеріями і пригнічують або уповільнюють ріст і розвиток фітопатогенних грибів та інших мікроорганізмів. Антибіотики можуть викликати у мікроорганізмів порушення синтезу клітинної стінки, функціонування мембран, синтезу білка і інгібування роботи дихальних ферментів.

Антибіотики згруповані в леткі і нелеткі з'єднання. Леткі антибіотики включають спирти, альдегіди, кетони, сульфіді, ціаністий водень і т. д., а нелеткими антибіотиками є полікетиди, циклічні ліпопептиди, амінополіоли, фенілпірол, гетероциклічні азотисті сполуки і т. д. [34].

Основним механізмом, який PGPB використовує для протидії шкідливим впливам фітопатогенів, є синтез одного або декількох антибіотиків [31].

Відома здатність досліджуваної культури *S. albus* до синтезу феназінів, що пригнічує ріст *Fusarium oxysporum* і *Gaeumannomyces graminis*, впливаючи на окисновідновний потенціал в клітинах грибів [35].

Нещодавно було виявлено здатність *S. albus* UN 44 синтезувати антибактеріальні та протигрибкові антибіотики, які відносяться до похідних фталальдегіду. Сполуки були ідентифіковані як діоктилфталат і 3-О-метилциклополова кислота (3-O-methylcyclopolic acid) [36]. Також, встановлено здатність культури синтезувати специфічні речовини - авермектини для боротьби з акаридами [37].

Гідролітичні ферменти

За дією на субстрат, а також за складом ферментного комплексу літичні ферменти можна розділити на:

- ✓ бактеріолітичні – ферменти, які гідролізують клітинну стінку грампозитивних та грамнегативних бактерій,
- ✓ дріждже - і міколітичні, які лізують дріжджі і мікроскопічні гриби.

Літичні ферменти, що лізують мікроскопічні гриби і дріжджі, мають слабшу дію на клітинні стінки бактерій, і в той же час, ферменти, специфічні до бактерій, є неактивними по-відношенню до м/о інших таксономічних груп. Гідролітичне розщеплення певних зв'язків клітинної стінки, зазвичай, призводить до лізису бактеріальної клітини. При порушенні клітинної стінки

бактерій - пептидоглікану, що визначає жорсткість структури, відбувається руйнування всього комплексу.

За іншою класифікацією літичні ферменти діляться на 3 типи:

Перший тип - глікозидази, які руйнують полісахаридні ланцюги. До них відноситься N-ацетилмурамідаза – фермент, який гідролізує 1,4- глікозидний зв'язок між N-ацетилмурамовою кислотою та N-ацетилглюкозаміном в молекулах пептидоглікану клітинної стінки бактерій [37].

Глікозидази здатні мати як пряму літичну дію так і відігравати важливу роль при лізисі клітинної стінки м/о комплексом літичних ферментів.

Другий тип - N-ацетилмураміл-L аланіламідаса, що розщеплює зв'язок між мурамовою кислотою полісахариду і пептидною частиною.

Третій тип - пептидази, які гідролізують пептидні зв'язки пептидоглікану. Існують бактеріолітичні пептидази з різною субстратною специфічністю - деякі розщеплюють зв'язок гліцил-гліцил в перехресно-зв'язаних містках, інші – зв'язок гліцил-аланін і т.д. [37].

Останнім часом увагу дослідників все більше привертають хітинази та мікроорганізми, що їх продукують. В основному це зумовлено тим, що ферменти, що входять до складу хітинолітичного комплексу, володіють високою протигрибковою активністю [38].

До складу метаболітів *Streptomyces albus* входять С-хітинази [39], глікозидази, літичні ендопептидази, мурамідази, протеази та амілази, комплексна дія яких призводить до руйнування широкого спектру мікробних культур [40].

Численні рослини реагують на зараження грибовими фітопатогенами, активуючи кодований рослиною синтез ряду грибкових ферментів, що руйнують клітинну стінку. Ферменти включають хітинази, яка розкладає хітин, він є залишком β - (1, 4) -N- ацетілглюкозамінового полімеру і є невід'ємною

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

частиною клітинної стінки багатьох фітопатогенних грибів; β -1,3-глюканазу, інший вуглевод клітинної стінки; протеаза, яка може руйнувати білки клітинної стінки; і ліпазу, яка може руйнувати деякі ліпіди, асоційовані з клітинною стінкою, які можуть до деякої міри індивідуально лізувати грибкові клітини.

В якості одного з можливих механізмів антагоністичної дії бактерій, в тому числі і ендofітний, розглядається синтез ними позаклітинних гідролаз, таких як хітинази і β 1,3 глюканази, здатними руйнувати структурні полісахариди клітинної стінки гриба (хітин і глюкани) і лізувати гіфи грибів.

Хітинолітичну активність часто розглядають як один з найважливіших критеріїв, що визначають антагоністичні властивості бактерій. Однак питання про антигрибкові функції багатьох бактеріальних хітиназ залишається дискусійним у зв'язку з суперечливими даними, пов'язаними як з різноманітністю бактеріальних штамів, що їх виробляють, так і зі структурою хітину клітинних стінок грибів, на які вони впливають [32].

2.2 Схема хімічних перетворень

Ауксин IAA

Велика частина ауксинів / IAA синтезується з амінокислоти триптофан. Слід зазначити, що різні RGPB можуть мати один, два або навіть три функціональних шляху біосинтезу IAA, що дозволяє припустити, що синтез IAA, безсумнівно, дуже важливий для життя і функціонування бактерії.

Біосинтез триптофану починається з хоризмової кислоти метаболічного вузла в п'ятиступінчастій реакції, що кодується генами *trp*. Починаючи з триптофану, принаймні п'ять різних шляхів є описаними для синтезу IAA, і більшість шляхів показують схожість з тими, які описані у рослин, хоча деякі проміжні сполуки можуть відрізнятися (Рис. 2.2.1):

1. Утворення IAA за допомогою індол-3-піровиноградної кислоти і індол-3-оцтового альдегіду виявлено в більшості бактерій;

2. Перетворення триптофану в індол-3-оцтовий альдегід може включати альтернативний шлях, по якому утворюється триптамін;
3. Біосинтез IAA за допомогою утворення індол-3-ацетаміду повідомляється для фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* і *E. herbicola*;
4. Біосинтез IAA, який включає перетворення триптофану в індол-3-ацетонітрил;
5. Незалежний від триптофану шлях, більш поширений в рослинах, також виявлений в ціанобактеріях [27, 41].

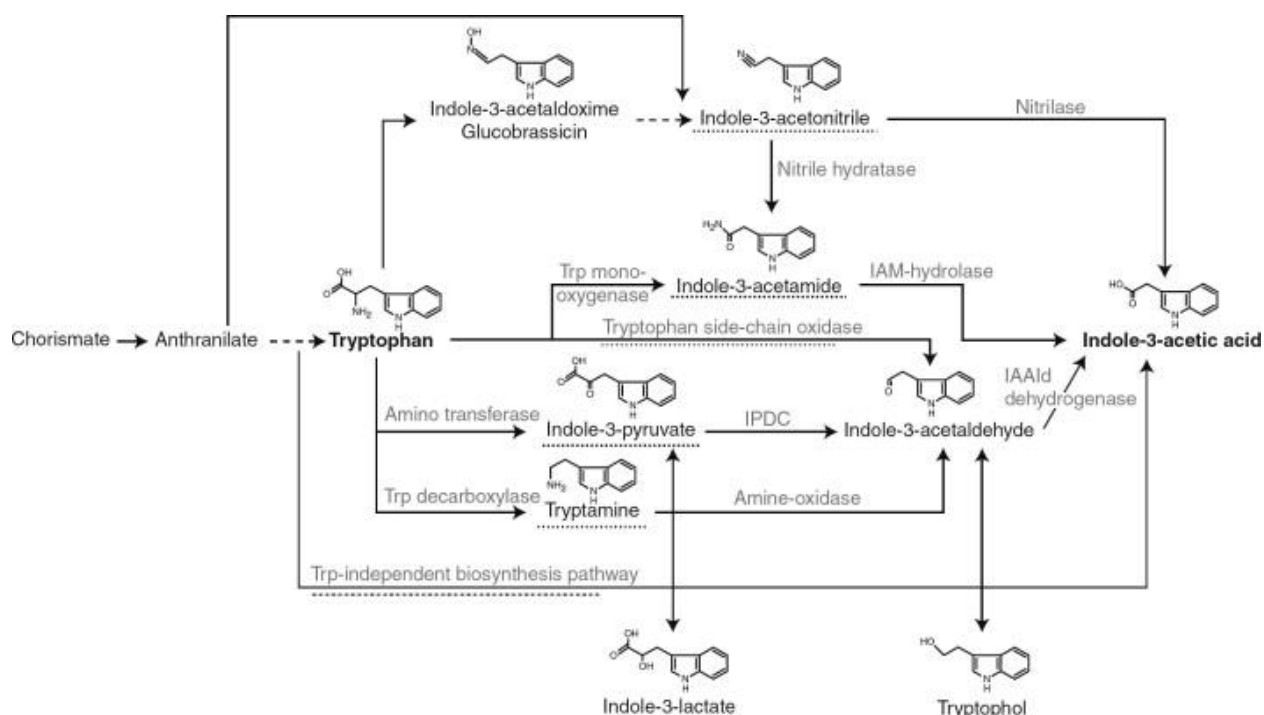


Рис. 2.2.1. Огляд різних шляхів синтезу IAA у бактерій. Проміжна ланка, що відноситься до назви шляху або самого шляху, підкреслена пунктирною лінією. Позначення: IAAld - індол-3-ацетальдегід; IAM - індол-3-ацетамід; IPDC - індол-3-піруватдекарбоксилаза; Trp – триптофан [27].

Додавання поживних середовищ з триптофаном збільшує вироблення IAA у більшості ризобактерій [27].

Цитокиніни

Найбільш дослідженим цитокініном є зеатин, тому саме його синтез як рослинною так і бактеріальними клітинами, є найкраще вивченим. У клітині цитокініни утворюються переважно з азотистої основи аденіну.

На рисунку 2.2.2 зображено модель біосинтезу і метаболічного шляху цитокінінів у рослин і бактерій. У рослин ізопентенильний фрагмент з диметилаллілдіфосфата (DMAPP) переноситься в АТР / АДФ, в той час як бактеріальні шляхи починаються з АМР(аденозинмонофосфат/аденілова кислота). Біосинтез цитокінінів бактерій може також початися з перенесення ізопентенильного фрагмента з 1-гідрокси-2-метил-2- (Е) -бутеніл-4-дифосфата (HMBDP) в АМР. Активні цитокініни затінені [42, 43].

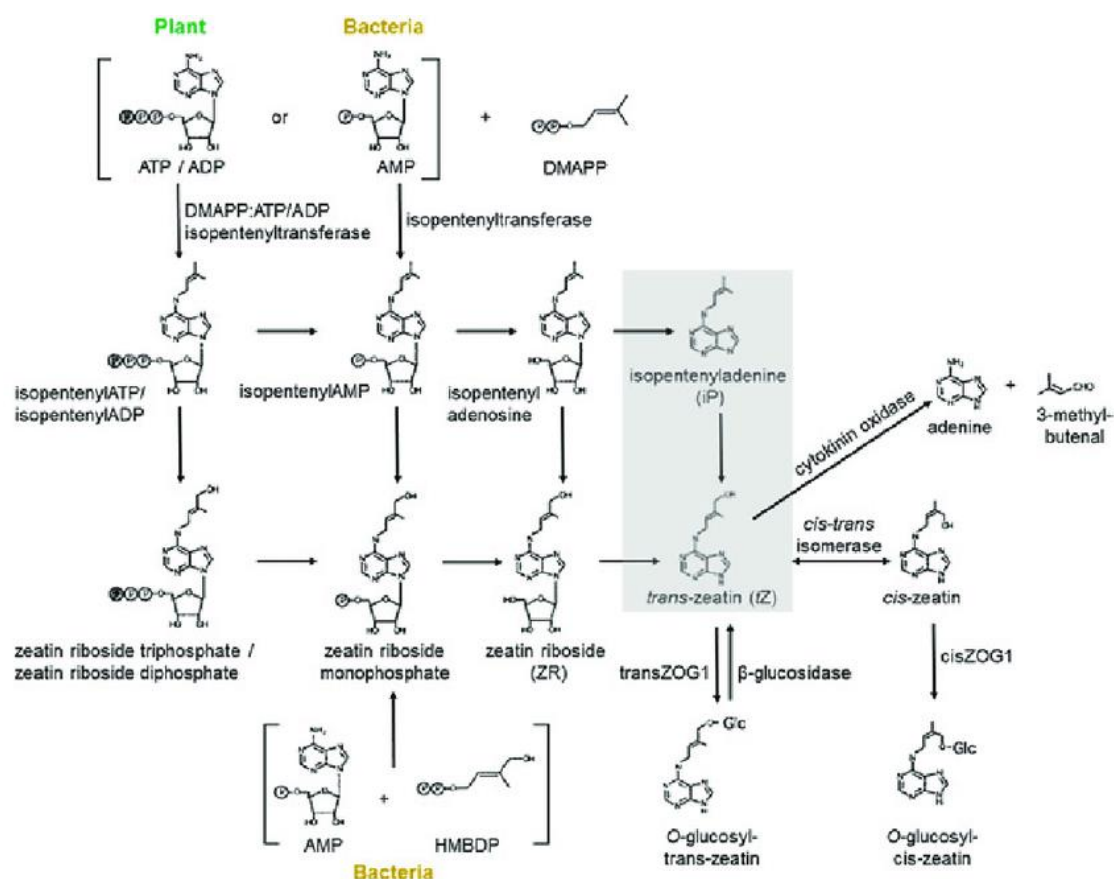


Рис. 2.2.2. Модель біосинтезу і метаболічного шляху цитокінінів у рослин і бактерій [42].

Гібереліни (GA)

Біосинтетичний шлях гіберелліну був широко вивчений на рослинах, грибових штаммах та бактеріях. Біохімічний шлях синтезу GA починається від гераніл-геранілдифосфату (GGPP) через ізопентенилдифосфат (IPP), який є 5-вуглецевим будівельним блоком для всіх терпеноїдних / ізопреноїдних сполук [44].

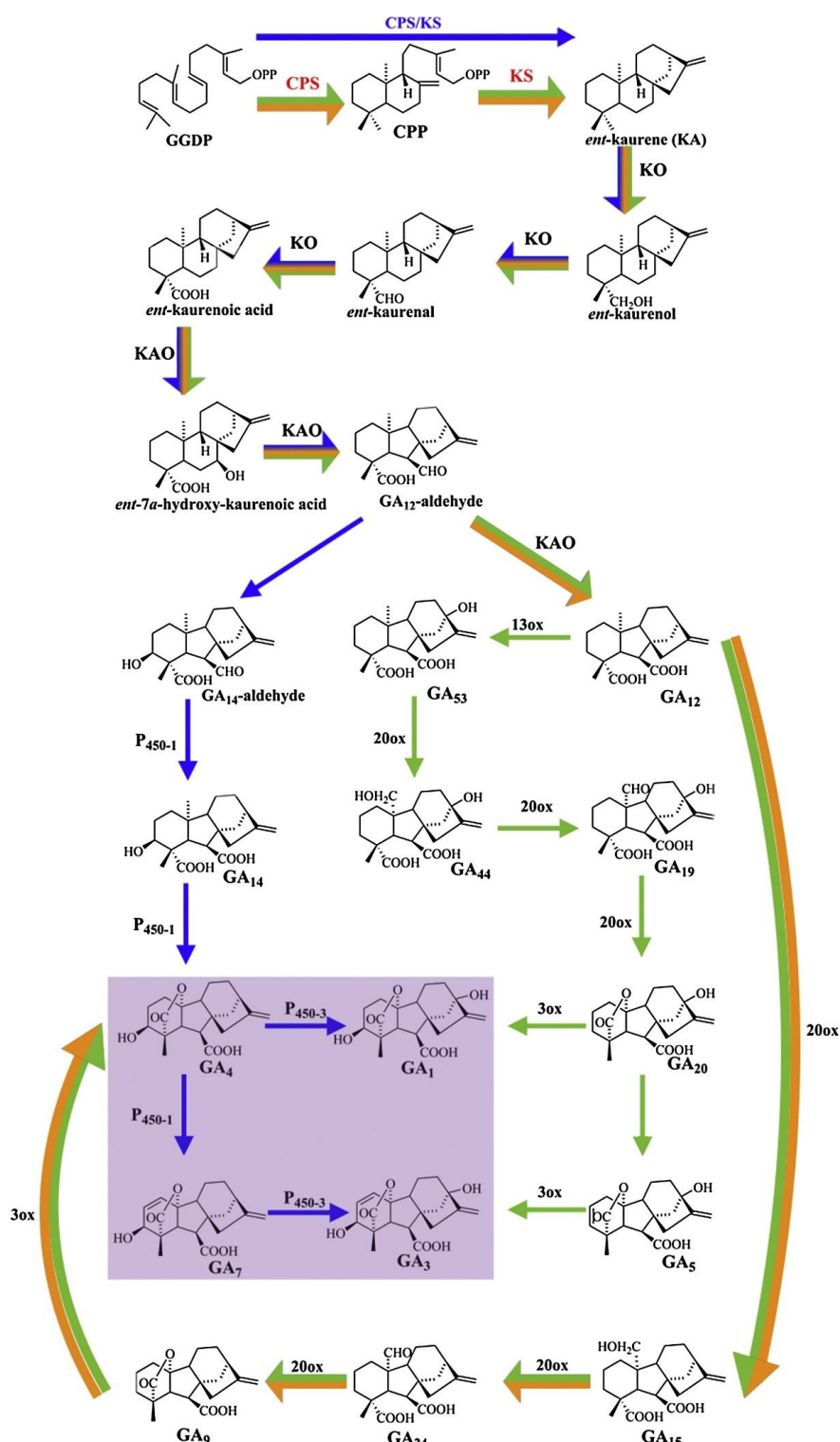


Рис. 2.2.3 Уніфікований біосинтетичний шлях гіберелінів [44]. Шлях біосинтезу в рослин (зелені стрілки), грибів (сині стрілки) та бактерій (жовті стрілки). Проміжні молекули, кінцеві продукти та відповідальні ферменти показані для кожного кроку. Біоактивні гібереліни виділені фіолетовою заливкою. Позначення: GGDP - геранил-геранилдифосфат; CPS - ент-копалдифосфат синтаза; CPP - ент-копалдифосфат; KS - ent-kaurene syntase; CPS / KS - біфункціональна терпенова циклаза; КА - ent-kaurene; КО – ент кауреноксидаза; КАО - ент-кауренова кислота оксидаза; 13окс -13 оксидаза; 20окс - 20-оксоглутарат-залежна діоксигеназа; 3окс - 3 оксидаза; P450-1 - цитохром P450 монооксигенази 1; P450-3 - цитохром P450 монооксигенази 3.

Перший проміжний продукт, специфічний для GA, генерується за два етапи циклізації від GGDP через енто-копалілфосфат (CPP). Послідовне окислення ент-каурену в положенні C-19 за допомогою ен-кауренолу та ент-кауреналу дає ен-кауренову кислоту, яка додатково окислюється для отримання ен-7 α -гідроксикауренової кислоти. Кінцеве окислення в положенні C-6 β призводить до утворення GA12-альдегіду. Ці початкові етапи шляху схожі у грибів, вищих рослин та бактерій, оскільки основна відмінність полягає в тому, що у грибів використовується лише одна біфункціональна терпенова циклаза (CPS / KS) для утворення енте-каурену з GGDP, тоді як у рослин та бактерій в синтезі беруть участь два ферменти: ен-копал-дифосфат-синтаза (CPS) та ен-каурен-синтаза (KS). У бактерій біосинтез GA продовжується по шляху non-13-hydroxylation рослин, де GA12-альдегід перетворюється в GA12 через C7 окислення, потім GA12 окислюється при C20 до утворення GA15, GA15 окислюється до утворення GA24, згодом втрата C20 і утворення лактонового кільця призводить до утворення GA9. GA9 проходить процес гідроксилування 3 β для утворення біоактивного гібереліну GA4 [44].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Препарат – рідкий біостимулятор росту рослин, випускається у бутелях об'ємом 1-5л. Основними діючими речовинами є – комплекс гідролітичних ферментів та фітогормони. Характеристика кінцевої продукції виробництва описана в (табл.2.1.3).

Таблиця 2.3.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Показник	Норма
Склад	Фугат культуральної рідини <i>Streptomyces albus</i> . Комплекс гідролітичних ферментів, фітогормони. Літична активність препарату становить мінімум 1200 од/мл. Допоміжні речовини: Меляса, соєве борошно, незначні залишки клітин продуценту, антибіотики та інші речовини синтезовані продуцентом.
Зовнішній вигляд	Бутилі пластикові об'ємом 1 та 5 літрів; вміст – рідина, прозора-сірого кольору різної інтенсивності.

2.4 Методи очистки цільового продукту

Перш ніж розглядати методи очистки цільового продукту, розглянемо можливі форми випуску препаратів стимуляторів росту рослин, що в основному, мають 3 форми:

1. Рідкий препарат – суспензія культуральної рідини біологічного продуценту, що містить безпосередньо метаболіти та вегетативні клітини і спори продуцента. Даний препарат не потребує жодних методів виділення чи очистки, і вимагає лише асептично проведеного виробничого біосинтезу та подальшого пакування. Незважаючи на простоту отримання, величезним недоліком даної форми випуску є дуже малий час зберігання продукту (2-4 місяці при $T=4-10^{\circ}\text{C}$), що обумовлює періодичну роботу підприємства,

беручи до уваги той факт, що необхідність у препараті є не круглорічною (враховуючи навіть не лише обробку насіння, а й підживлення безпосередньо ґрунту).

2. Рідкий препарат – фугат культуральної рідини біологічного продуценту, що містить лише метаболіти та дуже незначну кількість безпосередньо клітин м/о. Даний препарат потребує відділення біомаси з культуральної рідини, після виробничого культивування. В той же час, завдяки переважній відсутності клітин продуцента, його термін зберігання є довшим, і дозволяє підприємству працювати круглорічно.
3. Сухий препарат – порошкоподібний препарат, що фактично є біомасою культуральної рідини біологічного продуцента. Потребує виділення центрифугуванням та подальшого висушування. Можливе внесення аеросилу у концентрації 0,5% перед висушуванням та подальше гранулювання продукту. Препарат містить значну кількість спор у продукті – близько 1 млрд.спор/г. Розфасовується у поліетиленові пакети та може зберігатися до 2 років при температурі до 20°C, а перед використання розводиться водою або поживною композицією для більш швидкого відновлення активності культури.

В даній роботі обраний варіант отримання рідкого препарату – фугату, враховуючи можливість більш тривалого його зберігання. І як було зазначено раніше, цільовими продуктами препарату є комплекс фітогормонів та гідролітичних ферментів, що самі по собі є високоактивними сполуками і використовуються рослиною в дуже незначних кількостях, та при перевищенні концентрації можуть викликати погіршення стану чи навіть загибель насіння рослини. В той же час, отриманий препарат (фугат) містить значну кількість даних речовин, і потребує розведення робочого розчину приблизно в 100 разів [18]. Враховуючи, що біосинтез продукту відбувається непатогенними, вільноживучими мікроорганізмами та має безпечний в незначних

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

концентраціях склад компонентів [2], додаткове очищення препарату для виділення цільових продуктів є недоцільним.

В той же час, для отримання безпосередньо фугату найкращим варіантом є сепарування культуральної рідини саме центрифугуванням, що є узагальненою практикою розділення суспензій. Перевагами використання центрифуг є значно вища швидкість розділення, ніж у фільтрах і відстійниках, завдяки більшій рушійній силі, що виникає при обертанні ротора центрифуги разом з суспензією, що знаходиться в ній.

Стабільність препарату є стійкою, і його літична активність змінюється незначно, тому додавання стабілізатора чи консерванту не є необхідним фактором [37].

Об'єм фасовки у бутілі об'ємом по 1 та 5 літрів є усталеною практикою для ринку рідких біопрепаратів. Так як переважна кількість користувачів даної продукції є досвідченими фермерами чи безпосередньо агрокомпаніями та оперують більш менш значними обсягами насіння, то формат випуску об'ємом 1 л є зручним як для невеликих об'ємів виробництва, а 5 л – оптимальний варіант для масштабних виробництв, через доволі значний об'єм, який в той же час легко перевозити, зберігати і розводити.

					<i>ДП 6119. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

PGPB може стимулювати ріст рослин як прямими, так і непрямими механізмами:

- Прямі механізми визначаються як використання тих бактеріальних ознак, які призводять до прямої стимуляції росту рослин безпосередньо, полегшуючи отримання ресурсів або модулюючи рівні гормонів рослин. Вони включають виробництво ауксину, АСС-деамінази, цитокініну, гібереліну, абсцизової, саліцилової і жасмонової кислоти, і засвоєння заліза бактеріальними сидерофорами [27, 31-32, 45-46].
- Непрямі механізми - процеси, які допомагають рослинам активно рости в умовах стресу навколишнього середовища (абіотичний стрес) або захищати рослини від інфекцій (біотичний стрес), як грибів, так і бактерій. Непрямі механізми включають різні метаболіти з антибіотичною активністю - антибіотики, біосурфактанти, ціанистий водень (синильна кислота) і ін ; синтезом гідролітичних ферментів, таких як хітинази, целюлази, глюканази, протеази і ліпази, які можуть руйнувати клітини патогенних грибів і ряд з'єднань ефекторів патогена; а також включає індуковану системну стійкість [27, 32, 45-46].

Ауксин/ IAA

Як правило, IAA, що вивільняється ризобактеріями, втручається у багато процесів розвитку рослин, оскільки ендогенний пул IAA рослин може бути змінений в результаті придбання IAA, який секретується ґрунтовими бактеріями [27]. IAA синтезується декількома незалежними шляхами біосинтезу і в основному виробляється в зародку і молодих листках рослини. У молодих стебел IAA викликає швидке збільшення розтяжності клітинної стінки. IAA сприяє зростанню допоміжних і формуванню нових бруньок. Крім розвитку, IAA грає вирішальну роль в обпаданні листя і квітів [32].

IAA бере участь практично у всіх аспектах зростання і розвитку рослин, а також у відповідних діях захисту. Така різноманітність функцій відбивається в

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

надзвичайній складності біосинтетичних, транспортних і сигнальних шляхів ІАА. Як правило, ІАА впливає на розподіл, розтягнення і диференціювання рослинних клітин; стимулює проростання насіння і бульб; збільшує швидкість розвитку ксилеми і кореня; контролює процеси вегетативного росту; ініціює утворення бічних і випадкових коренів; опосередковує реакції на світло, гравітацію і флуоресценцію; впливає на фотосинтез і утворення пігменту, біосинтез різних метаболітів і стійкість до стресових умов.

Різні рослини чутливі до різних рівнів ауксина; це включає в себе різні види рослин і сорти, а також рослини різного віку. Крім того, оптимальний рівень ауксину, який ефективний для стимулювання росту рослин, приблизно на п'ять порядків нижче для коренів в порівнянні з пагонами. Крім того, концентрація синтезованого в рослинах ауксина визначає його вплив на стимуляцію або пригнічення росту рослин. Концентрація ауксину в рослині може бути або субоптимальною, або оптимальною, так що додавання бактеріального ауксина, який може бути поглинений рослиною, може змінити рівень гормонів в рослині до оптимального або зверхоптимального. Таким чином, бактеріальна ІАА, що продукується RGPB, може або стимулювати розвиток кореня в випадках, коли концентрація рослини нижче оптимальної, або пригнічувати розвиток кореня в випадках, коли рівень ауксину вже є оптимальним [27,32].

1-аміноциклопропан-1-карбоксилат (ACC) дезаміназа

Етилен є ключовим газоподібним гормоном, який контролює різні фізіологічні процеси в рослинах, включаючи зростання, старіння, дозрівання плодів і реакцію на абіотичні і біотичні стреси. Незважаючи на деякі з цих позитивних ефектів, газ зазвичай перешкоджає росту рослин.

Деякі ґрунтові бактерії серед ризобактерій, які сприяють зростанню рослин (PGPR), можуть стимулювати ріст рослин навіть в стресових умовах шляхом зниження рівня етилену в рослинах [32].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

Відомо, що етилен функціонує при різних фізіологічних подіях, таких як старіння, включаючи опадання листя, і дозрівання плодів. Етилен також добре відомий як гормон стресу. Різні шкідливі хімічні речовини, екстремально високі температури, охолодження або замерзання, нестача води, повені, хвороби і механічні травми створюють стресові умови для рослин. У відповідь на ці подразники рослини виробляють більше етилену, ніж в нормальних умовах, що призводить до уповільнення їх зростання [45].

Рослини виробляють етилен у два різні етапи у відповідь на стресові подразники. На першому етапі етилен виділяється з раніше існуючих АСС, і його кількість невелика. Відомо, що етилен грає важливу роль в захисті рослин, стимулюючи активність генів, пов'язаних зі стресом. На другому етапі виробництво етилену відбувається відносно пізно (через 1-3 дні після застосування стимулу), але його кількість вище, ніж на першому етапі. Відомо, що ця друга і більша кількість етилену викликає такі проблеми, як інгібування росту і шкідливий вплив на рослини, включаючи старіння, хлороз і опадання.

Метаболічні шляхи етилену до теперішнього часу добре відомі. У вищих рослин S-аденозіл- 1 метіонін (S-AdoMet) виробляється з метіоніну. Використовуючи S-AdoMet, АСС-синтаза біосинтезує АСС, і АСС перетворюється в етилен за допомогою АСС-оксидази. Відомо, що серед ферментів, які беруть участь в шляху біосинтезу, АСС-синтаза грає обмежуючу швидкість стадію. Виробництво етилену в рослинах контролюється регуляцією експресії генів АСС-синтази і АСС-оксидази. Етилен може бути катаболізований до етиленгліколю або етиленоксиду, але цей шлях може не мати істотного значення, оскільки молекули етилену легко дифундують з рослинних клітин. Інший катаболітичний шлях здійснюється за рахунок використання АСС-деамінази, бактеріальної природи, яка може бути використана для зростання бактерій.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

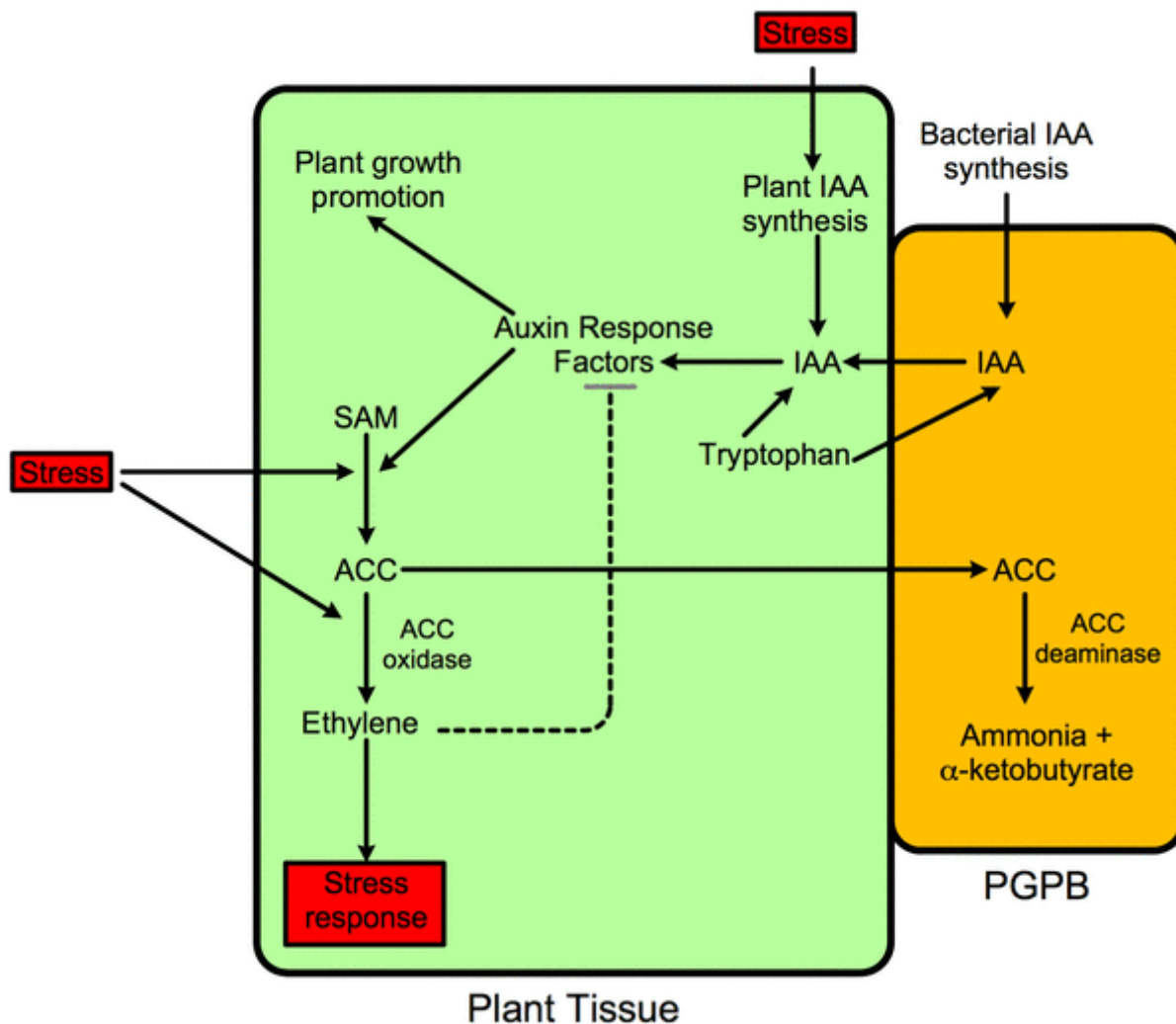


Рис. 2.5.2 Схематичне зображення стимуляції росту рослин PGPB, що містить ACC-деамінази [45].

Стрес збільшує як IAA, так і синтез етилену в рослині, в кінцевому підсумку знижуючи зростання рослини. У разі штамів PGPB, які містять ACC-деамінази, рівні етилену знижуються, тим самим знімаючи деякі затримки росту, що викликаються підвищеним етиленом. В кінцевому підсумку ACC перетворюється в аміак і α -кетобутират. Це дозволяє бактеріальній IAA продовжувати стимулювати ріст рослин. Таким чином, PGPB, які продукують як IAA, так і ACC дезамінази, знижують ступінь, в якій широкий діапазон стресів навколишнього середовища пригнічує ріст рослин. Ці PGPB захищають рослини від інгібуючого впливу стресів, що викликають етилен [45].

Засвоєння заліза

Залізо відіграє важливу роль в системі фотосинтезу рослин, оскільки воно є невід'ємною частиною хлорофілу, а також бере участь в широкому спектрі різних біосинтетичних механізмів. Проте, кількість присутнього розчинного заліза часто недостатньо для максимальної врожайності [47].

Незважаючи на те, що залізо є одним з найбільш поширених елементів на земній поверхні, рослини і багато ґрунтових м/о не можуть легко поглинути достатньо заліза для свого зростання через нерозчинність заліза, гідроксидів заліза (Fe^{3+}), який незначно розчинний і не може бути легко перенесений в клітини. Щоб вирішити цю проблему, деякі бактерії, гриби і рослини виділяють низькомолекулярні ($\sim 400\text{-}1000$ Да) спеціалізовані залізов'язуючі молекули - сидерофори, в ґрунт для видалення заліза. Зокрема, сидерофори, які продукують RGPB, зв'язуються з Fe^{3+} з виключно високою афінністю (тобто $K_d=10^{-20}\text{-}10^{-50}$). Після зв'язування розчинний в даний час комплекс залізо-сидерофори поглинається специфічними рецепторами на поверхні бактерій або рослин, інтерналізуються і потім після відновлення до стану двовалентного заліза (Fe^{2+}) або розщеплення молекули сидерофори виділяється залізо. Як правило, сидерофори, які продукують RGPB, мають набагато більш високу спорідненість до заліза, ніж сидерофори, які продукуються рослинами або грибами, так що сидерофори з RGPB можуть секвеструвати навіть незначні кількості заліза.

Сидерофори - це низькомолекулярні молекули з трьома залізов'язуючих групами, з'єднаними гнучкою основою. Два атома кисню пов'язані з кожною функціональною групою, а іноді і азотом, який зв'язується з залізом. Ці функціональні групи є бідентантними (рис. 8), і тривалентне залізо може успішно зайняти три з цих груп, утворюючи шестикоординатний комплекс. Функціональні групи на мікробних сидерофорах в основному являють собою гідроксамати або катехолати; або інші функціональні групи, такі як карбоксилатні, цитратні або етилендіамінові фрагменти. Ці функціональні

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

групи можуть бути присутніми в комбінованій формі на одній молекулі. Сидерофори гідроксаматного типу поширені у грибів, в той час як катехолати, які зв'язують залізо більш тісно, ніж гідроксамати, поширені у бактеріальних сидерофорів [32].

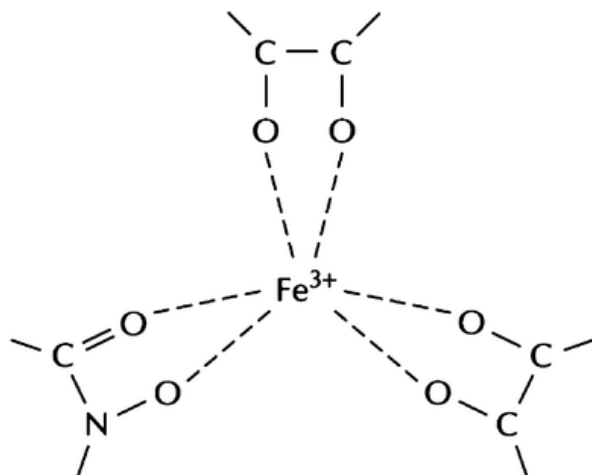


Рис. 2.5.2 Схематичне зображення трьох бідентатних груп молекули сидерофорів, що зв'язуються із залізом [32].

Бактеріальні сидерофори класифіковані в 4 групи: карбоксилати, гідроксамати, фенолкатехелати і піовердини. Накопичуються дані про те, що сидерофори можуть індукувати індуковану системну ризистентність (ISR) в рослинах [48].

Синильна кислота

Ряд RGPB, в тому числі бактерії роду *Streptomyces* мають здатність синтезувати синильну кислоту (HCN) [30, 49]. Якби HCN, що продукується цими бактеріями, був єдиним механізмом біоконтролю, використовуваним в більшості випадків, низький рівень HCN не був би особливо ефективним для запобігання проліферації більшості грибкових фітопатогенів. Однак через те, що RGPB, який може продукувати HCN, також синтезує деякі антибіотики або ферменти, що руйнують клітинну стінку, було відзначено, що низький рівень HCN, синтезованого бактерією, покращує ефективність протигрибкового засобу, спрямованого проти грибкових патогенів, тим самим гарантуючи, що гриби не розвинути стійкість до конкретного протигрибковим речовини. Таким

чином, HCN, синтезований PGPB, діє синергічно з іншими методами біоконтролю, використовуваними тієї ж бактерією [32].

Індукована системна резистентність (ISR)

Індукована системна резистентність (ISR) визначається як фізіологічний стан поліпшеної захисної здатності, що викликається у відповідь на певний стимул навколишнього середовища. PGPR викликає системну стійкість багатьох рослин до кількох стресових факторів навколишнього середовища. Створюються сигнали і активується захисний механізм через судинну систему під час патогенної інвазії, яка призводить до активації величезної кількості захисних ферментів, таких як хітинази, β -1,3-глюканаза, поліфенолоксидаза, пероксидаза, ліпоксигенази разом з деякими інгібіторами протеїнази. ISR не специфічний щодо конкретного патогена, але допомагає рослині контролювати численні захворювання. ISR включає передачу сигналів жасмонату та етилену в рослині і ці гормони стимулюють захисні реакції рослини-господаря проти різних патогенів рослин [27, 32]. Різні окремі бактеріальні компоненти індукують ISR, такі як ліпополісахариди, циклічні ліпопептиди, сидерофори, 2,4 -діацетилфлороглюцин, гомосерин-лактони і летючі речовини, такі як 2,3 -бутандіол і ацетоїн. Хоча переважна більшість PGPR викликають ISR у рослин, фундаментальні дослідження до теперішнього часу відсутні [27].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

Висновки до розділу №2

- Цільовими сполуками препарату, що розробляється є - комплекс гідролітичних ферментів та фітогормони.
- Препарат не потребує жодної очистки цільових продуктів
- Вид *Streptomyces albus* є продуцентом ауксинів та гіберелінів, та скоріше всього абсцизової кислоти і цитокінінів.
- Вид *Streptomyces albus* синтезує антибіотики: феназин, діоктилфталат і 3-О-метилциклополову кислоту, що є антибактеріальними та протигрибковими антибіотиками; та авермектин для боротьби з акаридами.
- До складу метаболітів препарату входять глікозидази, літичні ендопептидази, мурамідози, протеази та амілази, комплексна дія яких призводить до руйнування широкого спектру мікробних культур.
- Препарат стимулює ріст рослин прямими(виробництво ауксину, АСС-деамінази, цитокініну, гібереліну, абсцизової, саліцилової і жасмонової кислоти, і засвоєння заліза бактеріальними сидерофорами), і непрямими механізмами (синтез антибіотиків, синильної кислоти, гідролітичних ферментів, формування індукованої системної стійкості).

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкта

Генетично вид *Streptomyces albus* є доволі добре вивченим, і налічує 17 секвенованих геномів представників цього виду, довжиною від 6,78 до 9,25 млн. п.н. (Mb). Середня довжина складає 7,8459 Мб, середня кількість білка 6303, вміст GC%: 72,6. В той же час найбільш дослідженим на даний час є штаб *S. albus* J1074, на прикладі якого буде розглянуто геном, особливості хромосоми та механізми експресії генів [50].

Загальні особливості геному *S. albus* J1074

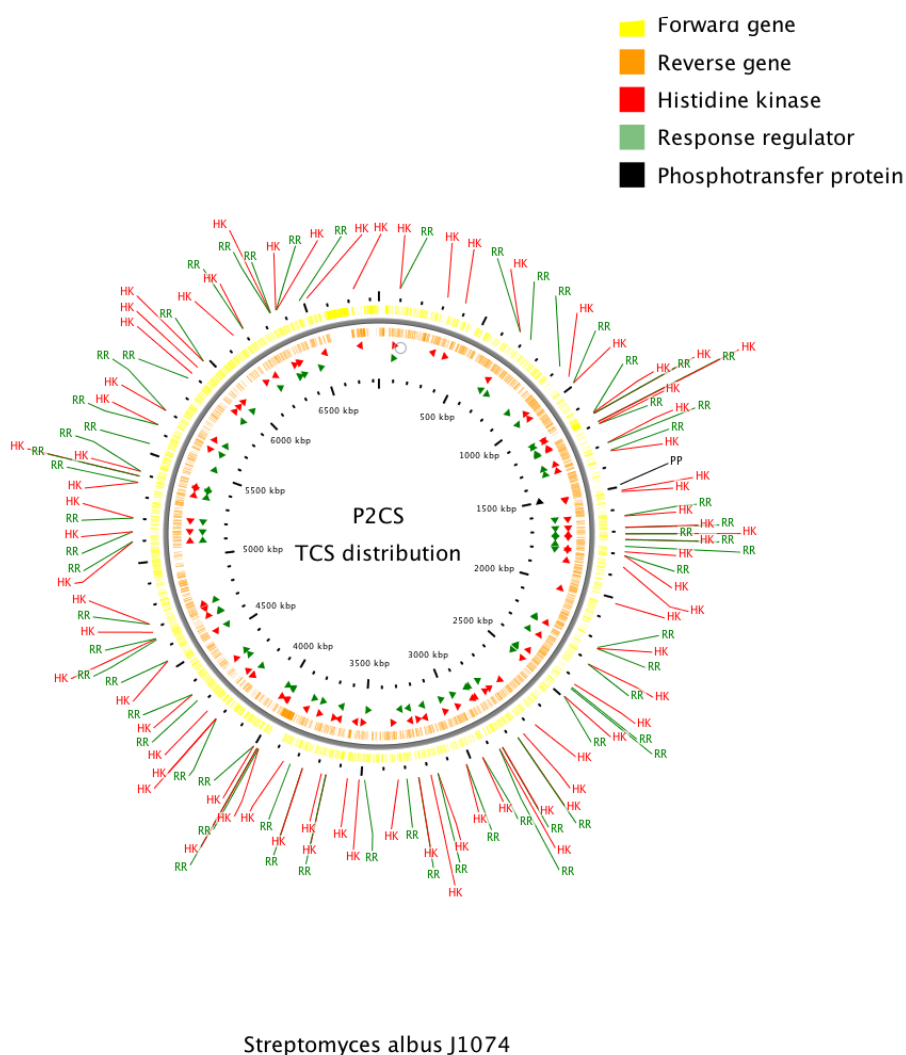


Рис. 3.1 Генетична карта *Streptomyces albus* [51].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Чорний С. І.			Методи отримання промислових продуктів		Літ.	Арк.
Перевір.		Карпенко Ю.В.						Аркушів
Керівн.		Карпенко Ю.В.					53	112
Затверд.							НТУУ "КПІ" ФБТ	

Основні особливості послідовності однієї хромосоми показані в табл. 3.1.
Таблиця 3.1. Загальні особливості хромосоми [52].

Ознака	Значення
Топологія	Лінійна
Загальний розмір	6 841 649
Термінальні обернені повтори	2 * 30 000 п.н.
Вміст G+C	73.3%
Кодуючі послідовності	5832
Середня довжина гена	1011 п.н.
Густина кодування	86,8%
Рибосомні РНК	7 × (16S-23S-5S)
Транспортні РНК	66 (41 вид)

Хромосома *S. albus* J1074 містить 5832 кодуючих послідовностей білка (CDS). З цих CDS 4665 (80%) приписані передбачувані функції, тоді як решта 1172 ORF (20%) є генами, які кодують гіпотетичні білки [52].

Пластичність і сприйнятливість

Гени транспозази виявляються по всій хромосомі в інтактних, усічених і зміщених формах. На відміну від *S. coelicolor*, в якому транспозази сконцентровані на плечах, практично всі елементи вставки в *S. albus* виявляються в області ядра (рис. 3.2). Лише 17 кодуючих послідовностей транспозази утворюють прості елементи вставки, тоді як інші не обмежені інвертованими повторами. Більшість з них діляться на 2 родини, такі як IS112- і IS1647-подібні елементи. Примітно, що 30 можливих генів транспозази лежать зліва від *oriC* корелюють з великим зміною складу ДНК з вмістом GC в лівій половині хромосоми (рис. 3.2). Високий ступінь горизонтального переносу гена може спостерігатися в 370 тисяч п.н. зліва від *oriC* (розміром приблизно 40 тисяч п.н.) який є областю, яка містить зміст GC нижче середнього і безліч вставок мобільних елементів. Крім того, *S. albus* має тільки три рестрикційні ендонуклеази і чотири сайт-специфічні метилтрансферази [52-54].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						54
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

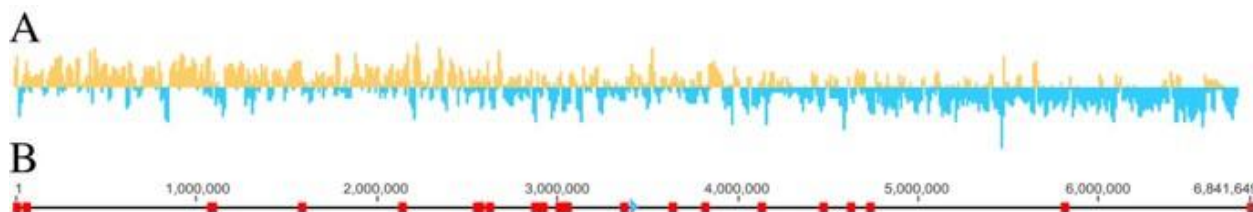


Рис. 3.2 Особливості лінійної хромосоми *S. albus* J1074. (A) GC-перекіс хромосоми, що показує надмірну представленість С над G (жовтий) і G над С (синій) в аналізованого ланцюга; (B) Розподіл рухомих елементів через хромосому *S. albus*. Джерело реплікації позначено синім трикутником [52].

Мінімізація генетичних дублікатів

S. albus J1074 кодує 35 сигма-факторів, що є невеликим числом порівняно з іншими стрептоміцетами, такими як *S. coelicolor* і *S. avermitilis* і т. д. З цих 35 сигма-факторів 25 є «ECF» (екстра-цитоплазматична функція) сигма-фактори, які реагують на зовнішні подразники і активують гени, що беруть участь в реакціях на різні стреси, гомеостаз клітинної стінки і розвиток повітряного міцелію. Як і з іншими стрептоміцетами, *S. albus* J1074 також має безліч двокомпонентних систем регулювання. Присутні 60 генів сенсорних кіназ, 42 з яких розташовані поруч з генами, що кодують регулятори відповіді, які утворюють двокомпонентні системи. Є також 27 генів, що кодують серин / треонін протеїнкінази в геномі *S. albus*. Оскільки число двокомпонентних систем передачі сигналу, що кодуються бактеріальним геномом, зазвичай пропорційно розміру геному і відображає діапазон сигналів, на які можуть реагувати бактерії, вважається, що передача сигналу є однією з областей, в якій *S. albus* зберіг більшість своїх функцій (позаклітинні сигнали) [55].

Ідентифіковано 33 передбачуваних ДНК-зв'язуючих білка. В цілому 442 гена (7,2%) беруть участь в транспорті в клітку або з неї, більшість з яких є ABC транспортерами (ATP-binding cassette transporters - АТФ-зв'язувальні касетні транспортери). До них відносяться пермеази, транспортери, що зв'язують іони, амінокислоти, пептиди або цукру, або мембранні транспортери, керовані АТФ. Крім того, *S. albus* J1074 має функції, які дозволяють широко

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						55
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

використовувати мультимедійні джерела. З клітини секретується широкий спектр ферментів, включаючи множинні протеїнази / пептидази, сім хітиназ, дві глюканази, дві амілази і одну целюлазу.

Володіючи всіма необхідними властивостями генома *streptomyces*, *S. albus* має тенденцію до мінімального дублювання генів і оперонів. Наприклад, *S. albus* містить один ген стійкості до хлорамфеніколу, а *S. coelicolor* несе два гена: *clmR1* і *clmR2* [52, 54].

Потенціал виробництва вторинних метаболітів

Геномне секвенування виявило 22 кластера для біосинтезу вторинних метаболітів (рис. 3.3). Розподіл цих кластерів не є рівномірним в хромосомі, так як 7 кластерів розташовані на хромосомних плечах, а інші 15 перебувають у великій «основній» області, яка містить більшість основних генів. З 22 кластерів 4 були оцінені для біосинтезу терпенів, 11 - для полікетидів або нерибосомних пептидів, 2 - для сидерофорів і 5 - для лантібіотиків та інших сполук [56, 57].



Рис. 3.3 Біосинтетичні генні кластери ідентифіковані в геномі *S. albus* J1074 [52].

Механізми експресії генів

Більшість генів, що кодують рибосомні та інші білки з функціями біосинтезу білків, демонструють безперервне зниження рівня транскриптів під час росту в тестованих умовах [52]. Ці гени спочатку високо виражені, але, коли клітини вступають в перехідну і стаціонарну фази, активність експресії генів знижується. Основна зміна в експресії відбувається в або до 12 год від точки інокуляції, що корелює з кривою зростання *S. albus*.

Початок стаціонарної фази росту також зазвичай характеризується сильною активацією *pho-regulon*, який контролюється системою двокомпонентних кіназ / регуляторів XNR_5270 (*phoP*) і XNR_5271 (*phoR*). Рівні транскриптів цих генів збільшуються, після виснаження фосфату з середовища [52].

Як показано в дослідженні [52], профілі експресії генів метаболізму азоту і його ключового регулятора *glnR* знижуються через 12 годин, тобто в момент, або безпосередньо перед припиненням зростання, що вказує на те, що без потреби в біосинтезі амінокислот, пуринів і піримідинів рівні азоту в середовищі стають менш обмежуючим фактором [52].

В цій же роботі [52], досліджено, що експресія генів розвитку збільшується, коли клітини готуються до диференціювання під час метаболічного перемикавання. Ген *whiP*, що впливає на координацію розтягування і септування повітряних гіф шляхом пригнічення клітинного поділу до потрібного моменту, швидко збільшується в експресії через 12 год, в той час як експресія гену *whiG*, який контролює споруючість в повітряних гіфах поступово зменшується з 12 до 24 годин і підтримується на одному рівні до 60 годин, що підтверджує, що *S. albus* спорюють в рідкій культурі і цей процес починається приблизно через 12 годин [58].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						57
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму

3.2.1. Використання природного та штучного добору

Для отримання того чи іншого продуцента відбір проб проводиться з тих місць, де їх місце розташування є найімовірнішим. Зразки проб вносяться у рідкі поживні середовища спеціального складу – елективні середовища. Дані середовища забезпечують переважний розвиток одного або цілої фізіологічної групи м/о та застосовуються на першому етапі виділення чистої культури бактерій - при отриманні накопичувальної культури. За рахунок зміни певних чинників, таких як джерела енергії, вуглець, азот, рН, температура, осмотичний тиск і т.д., створюються вибіркові умови для розвитку бажаного продуцента [59].

Наступним етапом є виділення чистої культури. Проби зразків накопичувальної культури висівають на щільні поживні середовища, де окремі клітини мікроорганізмів утворюють поодинокі колонії. Після подальшого пересіву отримують чисті культури продуцента, які складаються з популяцій клітин одного виду.

У випадках, коли необхідні ознаки, що виникли в результаті природної мінливості є недостатніми та мають потенціал до покращення, можливим варіантом є використання штучного добору.

У зв'язку з тим, що простим підбором не вдається отримати високоактивні продуценти, використовують методи селекції. Селекція штаму є невід'ємним процесом для відбору продуцентів при організації будь-якого біотехнологічного виробництва.

Метод селекції, що базується на спонтанних мутаціях, є обмеженим через те, що вони мають низьку частоту. Зміни в структурі ДНК відбуваються рідко. Щоб виникла мутація, ген повинен подвоїтись приблизно $10^6 - 10^8$ разів [60].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						58
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Проведення індукованого мутагенезу включає обробку культури різноманітними мутагенами:

➤ фізичними

- ✓ Іонізуюче випромінювання;
- ✓ Радіоактивний розпад;
- ✓ Ультрафіолетове випромінювання;
- ✓ Занадто висока або низька температура.

➤ хімічними (поділяються на групи)

- ✓ інгібітори синтеза попередників НК;
- ✓ алкілюючі сполуки;
- ✓ окисники;
- ✓ подовжувачі ниток ДНК;
- ✓ інгібітори синтеза РНК;
- ✓ речовини із комплексною дією на ДНК.

Залежно від мікроорганізму та необхідної мутації обирається можливий мутаген. Для мутагенів доза характеризується концентрацією мутагену та її експозицією при певній температурі. Висока частота мутацій, досягається при низькому відсотку виживання бактерій [59, 60].

Використання фізичного мутагенеза - ультрафіолетового випромінювання в селекції *Streptomyces albus*

В роботі [61], досліджувався вплив УФ-випромінювання на виживання штаму *Str. recifensis var. lyticus* 2435/М. Використовувався інтервал часу обробки спорової суспензії культури, що призводив до виживання культури на рівні 0,1-1 %, бо саме при такому рівні виживання існує велика вірогідність утворення мутантів із зміненою біосинтетичною здатністю.

Дана мутагенна обробка виявила значний вплив на гетерогенність культури та здатність до лізису грамнегативних культур [61]. Відбувався перерозподіл клонів у напрямку збільшення частини високоактивних варіантів

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

відносно неопроміненої культури, що проявилось як в істотному підвищенні відсотка високоактивних клонів у розсіві мутантів (ІЛА > 4), так і появі 3-5 % клонів з ІЛА > 6, які взагалі відсутні в популяції вихідної культури.

Використання УФ-випромінювання призвело до отримання мутантів, що відрізнялися підвищенням в 1,5 та 2 рази рівнем синтезу цільового продукту відносно до грамнегативних та грампозитивних м/о. Що вказує на позитивний ефект УФ-випромінювання на здатність до синтезу досліджуваним продуцентом ферментного комплексу [61].

Використання хімічного мутагенеза для отримання високоактивних стрептоміцин-резистентних продуцентів бактеріолізинів *Streptomyces albus*

N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідін (НГ) належить до сполук, що алкілюють ДНК-найсильніших з хімічних мутагенів. Мутаген утворює кон'югати з глутатіоном, що у відновленому стані є нуклеофілом і реагує з електрофільними сполуками. Реакція НГ з цистеїновим залишком глутатіону призводить до утворення діазометану - сполуки, яка спричиняє мутагенний ефект. Тому НГ широко застосовують у селекції мікробних продуцентів ферментів та антибіотиків, як окремо, так і у комбінаціях з іншими мутагенами та селективними факторами [62].

Для отримання високої частоти мутацій суспензію спор *S. albus* 2435 у досліді [62] обробляли НГ в концентрації 1, 2 та 3 мг/мл протягом 20 хв, щоб відсоток виживання становив 44,3, 31,5 та 22,3 % відповідно. Спостерігається чітка дозозалежність ефекту підвищення середнього ІЛА, збільшення відсотку плюс-варіантів та коефіцієнта варіації, щодо впливу НГ на біосинтетичну здатність. Підвищення варіабельності культури до 24,1 порівняно з 17,2 у контролі веде до появи як частки мінус-варіантів, так і варіантів-надсинтетиків [62].

Порівняння результатів антибіотико-резистентності показало, що виживання НГ-індукованих мутантів у присутності 0,5 мг/мл стрептоміцину збільшується у 2 рази порівняно з вихідною культурою. Хімічний мутагенез

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						60
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

призвів до отримання штамів з підвищеним у 1,6 рази рівнем синтезу цільового продукту, що свідчить про значну ефективність цього методу [62].

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Одним з методів використання гібридизації на *Streptomyces albus*, є отримання рекомбінантного штаму за допомогою генетичної трансформації.

У роботі [63], проводилось отримання рекомбінантних штамів *S. recifensis* шляхом горизонтального перенесення генів від *Bacillus subtilis* методом генетичної трансформації з метою створення продуцента з підвищеною біосинтетичною активністю.

Донором ДНК в їхньому досліді був штам *Bacillus subtilis* 168, стійкий до антибіотиків бензилпеніциліну і меропенему, відносно яких *S. recifensis* var. *lyticus* був чутливим, тому дані антибіотики були обрані селективними маркерами генетичного переносу. В результаті трансформації був отриманий рекомбінантний штам *S. recifensis* SrBs1, який завдяки горизонтальному переносу генів від *B. subtilis* 168 набув нових властивостей, а саме отримав антибіотикостійкість до бензилпеніциліна та меропенема. У рекомбінанта були виявлені значно підвищені літична та протеолітична активності. З чого був зроблений висновок, що вбудовування генів антибіотикорезистентності в геном клітин продуцента може не лише надавати реципієнту стійкості до антибіотиків, а й також сприяти розблокуванню генів синтезу ферментів [63].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						61
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Для отримання продуцента, що використовується в цій роботі, роду *Streptomyces albus* UN44 були потенційно задіяні наступні стадії :

1. Виділення штаму з асоціативної культури за допомогою елективного середовища. Штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* (реіндентифікований як *Streptomyces albus*) ІМВ Ас-5001 отриманий з Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України (ІМВ).

2. Підготовка штаму до селекційної роботи:

- Вивчення морфологічних форм культури, встановлення зв'язку між морфологічною формою клонів та їх біосинтетичною здатністю.
- Очистка культури. Висів вихідного штаму на чашки Петрі, та виявлення типової для даної культури форму та відхилення від неї. Далі колонії ізолюють на скошене агаризоване середовище. Ізольовані колонії як типової форми (не менше 100), так і доступне число її морфологічних варіантів оцінюють за рівнем морфології культури.

Клони з найбільш високими показниками порівняно з рівнем контролю, відбирають та перевіряють на продукцію в декількох повторностях, а потім відбирають один клон, що відрізняється високим та відтворюваним рівнем. Відібраний з розсіву вихідної культури клон з найоптимальнішими ознаками пересівають і відмічають морфологічну мінливість.

- Стабілізація культури. Отриманий на попередньому етапі клон знов розсівають на близько 100 субклонів, досліджують його морфологічну мінливість (якщо вона є) та рівень продукування.

Отримані дані розподіляють у варіаційний ряд та обробляють за допомогою статистичних методів:

- середнє арифметичне;
- середнє квадратичне;
- коефіцієнт мінливості.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						62
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Субклони, що потрапили в крайню праву частину цього ряду, відбирають та повторно оцінюють.

Якщо в другій вибірці наявна тенденція до зниження бажаних характеристик м/о, то проводять ще один етап клонування, вибравши з цього ряду найкращий клон, та будують третій варіаційний ряд і порівнюють їх коефіцієнти мінливості. Операція проводиться до того часу, поки коефіцієнти мінливості досліджуваних вибірок не будуть відрізнятися більше ніж на 5%.

Метою такого ступінчастого клонування є стабілізація вихідної культури за кількісною ознакою, отримання найбільш однорідної популяції.

3. Отримання мутантів. Відбувається в результаті ступінчастого індукованого мутагенезу при послідовній обробці суспензії спор вихідної культури штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* IMB Ac-5001 ультрафіолетовим випромінюванням в дозі 240 Дж/м² та азотистою кислотою (0,5 М NaNO₂) протягом 50 хвилин [25].

4. Відбір клітин з бажаними властивостями. Суспензія, що залишилась після обробки мутагеном розводиться і висівається на поживне середовище. Після отримання моноколоній аналізується кожна клітина окремо. Визначається індекс активності після проведення мутагенезу і порівнюється з індексом активності музейної культури. Відбираються найкращі варіанти та робиться висновок щодо результатів проведення індукованого мутагенезу.

5. Стабілізація штаму - відібраний клон пересівають і стабілізують для отримання однорідної популяції.

6. Отримання промислового продуценту.

Послідовність операцій при отриманні продуценту для виробництва препарату можна представити у вигляді рис. 3.3.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						63
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

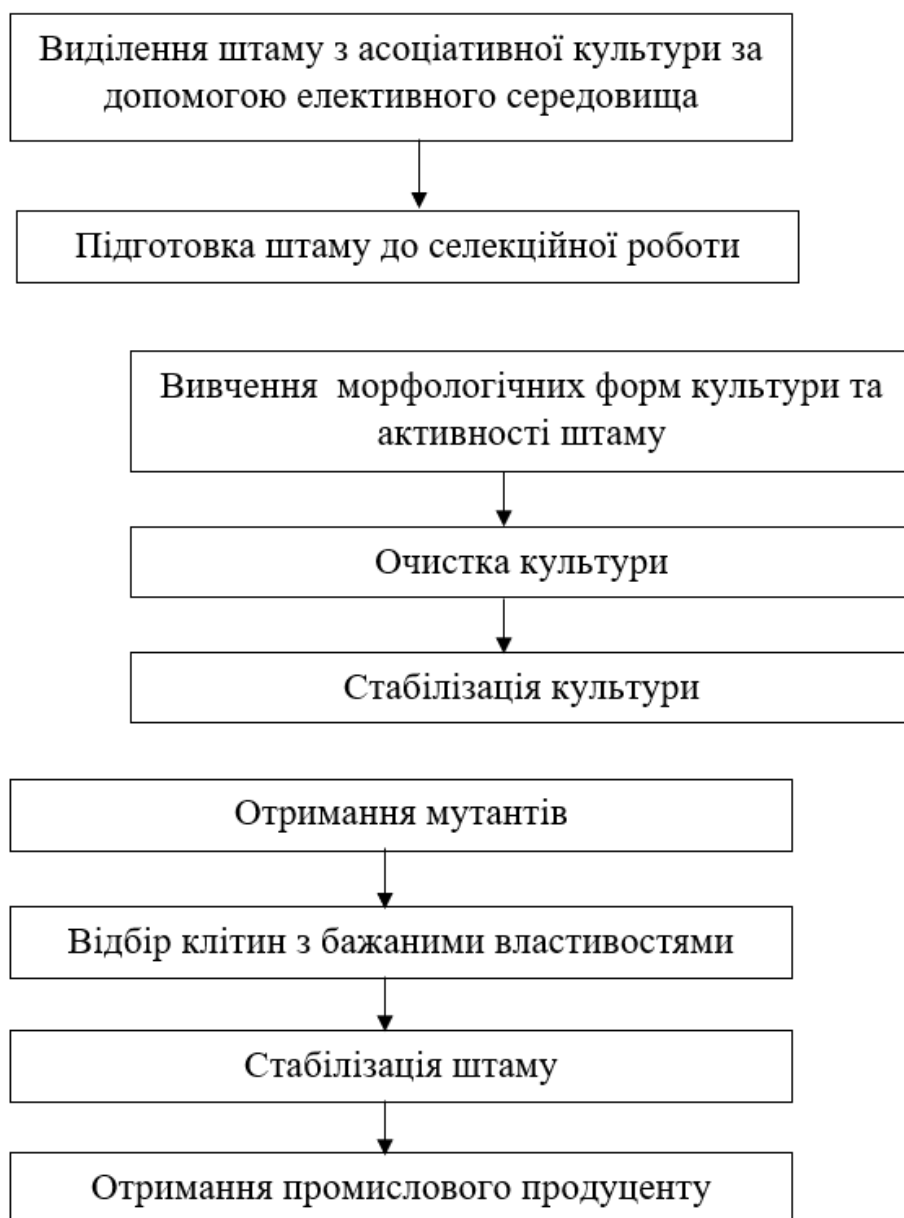


Рисунок 3.3. Схема потенційного отримання продуцента, що використовуються у виробництві препарату стимулятора росту рослин.

Висновки до розділу №3

- *Streptomyces albus* володіє одним з найменших геномів серед стрептоміцетів, та водночас має один з найвищих показників вмісту гуаніну та цитозіну GC (73.3%), що дозволяє йому секретувати значну кількість ферментів та інших біологічно активних сполук. Хоча, в той же час, *S. albus* має тенденцію до мінімального дублювання генів і оперонів.
- Отримання високопродуктивного штаму *Streptomyces albus* може бути успішно проведене, як за допомогою фізичного, так і хімічного мутагенезу, що мають значний вплив і викликають достатньо велике (у 1,5 – 2 рази) підвищення синтезу цільового продукту порівняно з вихідним штамом, що не піддавався обробці.
- Можливим методом створення промислових продуцентів *Streptomyces albus* біологічно активних речовин є гібридизація за допомогою генетичної трансформації.
- Складена схема отримання продуцента, що використовується в роботі та отримується завдяки ступінчастому індукованому мутагенезу при послідовній обробці ультрафіолетовим випромінюванням та азотистою кислотою.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: препарат - стимулятор росту рослин. НТД «Антисептичний ферментний препарат Цитал. ТУ 20.59-0207 0987 - 004.2015 (на дослідну партію)»

Продуцент: *Streptomyces albus* UN44 [25].

Технологія виробництва даного препарату, що розробляється у дипломному проекті, може бути запропонована для впровадження на ДП "Ензим", одним з напрямків роботи якого є випуск мікробних препаратів для рослинництва.

Призначення продукції та можливі галузі застосування: біологічний препарат для стимулювання росту рослин при пророщуванні насіння. Містить комплекс гідролітичних ферментів, фітогормонів та інших біологічних речовин, що легко засвоюються рослиною, активізують білковий обмін, сприяють захисту від патогенів, стимулюють ріст та подовжують стресостійкість.

Зовнішній вигляд та фізико-хімічні властивості: прозора рідина сіруватого кольору з можливим незначним осадом.

Форма випуску: пластикові бутілі об'ємом 1 та 5 л.

Маркування: на первинній упаковці вказують «Україна»; назву підприємства, товарний знак та адресу; назва препарату українською мовою; номер серії та термін придатності; умови зберігання і реєстраційний номер.

Умови зберігання: зберігати лише при температурі: $T=4-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці.

Транспортування: Усіма видами закритого транспорту при температурі $T=4-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Термін придатності: 12 місяців.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Чорний С. І.							
Перевір.		Карпенко Ю.В.							112
							НТУУ “КПІ” ФБТ		
Керівн.		Карпенко Ю.В.							
Затверд.									

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 Вода питна	ДСТУ 7525-2014	Кольоровість, каламутність, смак, запах, рН, жорсткість, вміст мікроорганізмів згідно ГОСТ	Компонент ПС, для приготування миючих розчинів
1.2 Глюкоза	ДСТУ 4464-2005	Зовнішній вигляд, запах, втрати маси при висушуванні.	Компонент ПС
1.3 Меляса	ДСТУ 3696-98	Зовнішній вигляд, розчинність, забарвленість, масова частка сухих речовин/сахарози	Компонент ПС
1.4 Соєве борошно	ДСТУ 4543-2006	Зовнішній вигляд, запах, вологість, мінеральні домішки.	Компонент ПС
1.5 Магній сірчаноокислий 7-водний	ГОСТ 4523-77	Масова частка основної речовини н/м 99,0%	Компонент ПС
1.6 Натрій хлористий	ДСТУ 2483-2001	Зовнішній вигляд, колір, запах, масова частка н/м 99,5%	Компонент ПС

1	2	3	4
1.15.1 Калій фосфорнокислий однозаміщений 3-водний	ТУ 6-09-4138-75	придатність в ІФА	Компонент ПС
1.7 Марганець II хлористий 4-водний	ГОСТ 612-75	Масова частка основної речовини н/м 98,0%	Компонент ПС
1.8 Кальцій хлористий	ТУ 6-09-4711-81	Порошок/гранули білого кольору, масова частка основної речовини н/м 96,5%	Компонент ПС

2. Допоміжна сировина

2.3 Водню пероксид	ДСТУ 7356-2013	Опис, кількісне визначення, пакування, маркування, термін придатності, паспорт постачальника	Для приготування дезинфікуючих розчинів
2.4 Засіб миючий синтетичний	ДСТУ 2207.1-93	Усі показники відповідно ДСТУ	Для приготування миючих розчинів
2.5 Розчин спиртовий 70%	ДСТУ 7457-2013	Масова частка спирту, 70%	Для приготування дезинфікуючих розчинів

3. Матеріали

3.1 Етикетки на препарат	ДСТУ ISO 780-2001	Зовнішній вигляд, повний, правильний, розбірливий друк	Для маркування готової продукції
3.2 Тара пластикова (бутилі)	ДСТУ 4260:2003	Зовнішній вигляд, основні розміри, форма, стійкість, якість.	Для розливу препарату

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6119. 00.000 ПЗ

Арк.

68

1	2	3	4
3.4 Рукавички гумові технічні тип А чи В	ДСТУ EN 420-2007	Цілісність, зовнішній вигляд	Індивідуальний засіб захисту при санобробці
3.5 Стрічка клейова (скоч)	Паспорт постачальника	Зовнішній вигляд, цілісність, маркування	Для заклеювання ящиків
3.6 Ящики з гофрованого картону	ДСТУ 9142-2019	Зовнішній вигляд, цілісність, маркування	Для пакування
4. Напівпродукти			
4.1 Посівний матеріал культур	Згідно виробничого регламенту	Мікробіологічна чистота	Для проведення виробничого біосинтезу

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1 Підготовка персоналу

ДР1.1.1 Медичний огляд

Кожного року персонал виробництва проходить медичне обстеження на підприємстві згідно з законодавством України у відповідності статті 17 Закону України «Про охорону праці» від 27 грудня 2019 року. Роботодавець організовує проведення попереднього і періодичних медичних оглядів працівників, зайнятих на роботах зі шкідливими чи небезпечними умовами праці. Працівники, які не пройшли медичне обстеження не допускаються до роботи. Працювати необхідно лише в комплекті технологічного одягу.

ДР1.1.2 Навчання та перевірка знань персоналу

Всі працівники перед початком роботи проходять підготовку, навчання, інструктаж з техніки безпеки, а також періодично проходять перепідготовку в процесі роботи на підприємстві. Організацію навчання і перевірки знань

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						69
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

працівників під час підготовки, перепідготовки та підвищення кваліфікації на підприємстві здійснюють працівники зі служби кадрів або інші спеціалісти, яким доручена організація таких робіт.

ДР1.2 Підготовка миючих та дезинфікуючих розчинів розчинів

Підготовку миючих та дезинфікуючих розчинів здійснюють, з дотриманням правил особистої безпеки: забезпечують працівників гумовими рукавичками, захисними окулярами, тощо. Дезинфікуючі розчини, такі як етиловий спирт та перекис водню заздалегідь закуповуються підприємством у необхідних концентраціях та кількостях для зберігання. Миючі засоби залежно від призначення можуть потребувати приготування розчину певної концентрації.

Для разового використання миючого розчину у реакторі з перемішувачем пристроєм проводять розчинення розрахованої кількості порошкоподібного миючого засобу у питній воді при температурі 40-50 °С та перемішуванні. Отриманий 5% миючий розчин переміщується у збірник та використовується для обробки виробничих приміщень та для мийки вузлів обладнання.

ДР 1.3 Підготовка приміщень

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

На початку процесу виробництва та після його проведення виробничі приміщення миють миючими та дезинфікуючими розчинами (розчин перекису водню). Обробку технологічних приміщень (вологе прибирання та їхню дезінфекцію) здійснюють розчином перекису водню з масовою часткою 3% та з миючим засобом. При виявленні у повітрі приміщення різноманітних грибів або спор масову частку перекису водню в робочому розчині необхідно збільшити до 6%.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						70
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Щоденне прибирання повинно проводитись щоразу після кожної зміни вологим способом. Після прибирання інвентар знезаражують протягом 2-3 год у розчині миючого засобу.

ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання приміщень проводять 1 раз на тиждень. Прибирання підлоги, стін, стелі, повітропроводів, підвіконня, поверхні всього обладнання, комунікацій і всіх виробничих меблів. Обробку проводять розчином перекису водню 3% з миючим засобом. У виробничих приміщеннях підлогу миють 0,1% розчином миючого засобу із розрахунку 100 мл/м² поверхні підлоги.

ДР 1.4 Підготовка технологічного одягу

Персонал має бути забезпечений технологічним одягом для роботи на виробництві. Одяг зберігається на складі в необхідних кількостях, та регулярно здається в хімчистку.

ДР 1.5 Підготовка обладнання, посуду та комунікацій.

Цей етап включає обробку обладнання та комунікацій до і після технологічного процесу. Підготовка складається з перевірки герметичності і справності обладнання, миття та стерилізації, і включає в себе такі етапи: мийку, обробку дезінфікуючими розчинами із подальшим ополіскуванням.

ДР 1.5.1 Мийка та дезінфекція обладнання і посуду

Мийка вузлів обладнання, що безпосередньо контактує з речовинами здійснюється синтетичними миючими засобами, разом з дезінфікуючими засобами при температурі +50 – 60 °С. З'ємні частини обладнання, які взаємодіють з препаратом, знімають, розбирають, ретельно миють в розчині миючого засобу з дезінфектором. Дезінфекція здійснюється 70% етиловим спиртом. Зовнішні поверхні обладнання обробляють як і виробничі приміщення.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						71
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 1.5.2 Ополіскування обладнання та посуду

Після миття внутрішні поверхні обладнання та комунікації, а також з'ємні частини обладнання після дезінфекції, ополіскують кілька разів водою очищеною. Обов'язково контролюється якість мийки. Відпрацьована вода рухається до знешкодження відходів. Посуд ретельно промивають гарячою водою, а потім 2-3 рази обробляють дистильованою водою.

ДР 1.5.3 Стерилізація обладнання та посуду

Процес стерилізації обладнання та вузлів обладнання проводиться гострою парою за тиску 0,2 МПа при температурі 140°C протягом 1 години, якщо не має інших заданих умов для апарату. Після цього слід провести перевірку апарату на герметичність, створюючи надлишковий тиск в системі 0,25 МПа і протягом 30 хв спостерігаючи за змінами показів манометра які мають бути незмінними. Посуд стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 1 години.

ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1 Забір повітря

Повітря з атмосфери забирають повітрозбірником, та транспортують через забірну шахту висотою 6-20 м. Очистка ведеться з початку при заборі повітря. Повітря проходить крізь решітку встановлену у повітропроводі для видалення крупних механічних часток – листя гілки та ін.

ДР 2.2 Попередня очистка повітря від механічних часток

Попередня очистка повітря від механічних часток має своєю метою видалення аерозольних механічних часток та попередження абразивного пошкодження компресійної апаратури. Для виконання цієї операції використовують фільтри попередньої очистки. Вони встановлюються на всмоктуючій лінії перед компресором або вентилятором та дозволяють видалити частки розміром більше 5мкм. Таке очищення дозволяє позбутися

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						72
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пилу, крапель вологи та частково мікроорганізмів. Для очищення повітря від грубого пилу використовують коміркові фільтри, заповнені фільтруючими матеріалами, наприклад вінілопластиковою сіткою(ФЯВ). Ефективність очистки складає не менш ніж 60%.

ДР 2.3 Компресування та транспортування повітря

Повітря стискають до потрібного тиску і направляють у систему повітропостачання. Це необхідно, щоб забезпечити належний об'єм подачі і відповідний до технологічних вимог тиск повітря. Нагнітання повітря здійснюється за допомогою компресора (турбокомпресора). Компресор здійснює адіабатне стискання повітря до тиску 0,2 МПа, в наслідок чого повітря може розігріватися більше ніж до 100 – 120 °С. Такий тиск потрібний для здолання гідродинамічного опору в системі транспортування повітря та стовпа культуральної рідини у ферментері.

ДР 2.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Основна задача на цьому етапі – досягнення оптимальної вологості та температури повітря. Для охолодження повітря при виході з компресора використовується теплообмінник. Для стабілізації потоку повітря і попередження його пульсацій задіюється ресивер. Основне призначення якого – згладжування пульсацій у тиску при роботі компресійного обладнання та видалення крапельної вологи.

ДР 2.5 Стерилізація повітря в головному фільтрі

Стерилізація повітря відбувається у фільтрі НЕРА. Цей фільтр призначений для тонкої очистки, тобто стерилізації повітря зі ступеню очистки 98% від мікроорганізмів та їх спор. При експлуатації фільтрів необхідна їх стерилізація. Стерилізація фільтрів здійснюється аерозолем формаліну. Контроль та оцінка ефективності роботи повітряних фільтрів обов'язкові.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						73
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.6 Стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі

Після очищення на головному фільтрі повітря поступає на індивідуальні фільтри окремо перед інокулятором та ферментером безпосередньо, де затримуються часточки до 0,5 мкм. Ці фільтри забезпечують ступінь очистки до 99,99% від мікроорганізмів та їх спор. В якості фільтруючого матеріалу використовуються матеріали на основі базальтового супер тонкого волокна, базальтового мікротонкого волокна або синтетичних волокон, які при використанні не потребують створення додаткового тиску в системі. У процесі очистки повітря контролюється тиск, перепади якого можуть свідчити про не достатню герметичність обладнання, та про можливу мікробну контамінацію або наявність механічних часток. Після очистки на індивідуальному фільтрі стерильне повітря надходить до боксів, ферментеру, тощо.

ДР 3 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріала

ДР 3.1 Стерилізація термостабільних компонентів поживного середовища

На вагах зважують наважки наступних компонентів, з розрахунку г/дм³ поживного середовища:

- Натрій хлористий NaCl-14,0;
- Калій фосфорнокислий однозаміщений 3-водний $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ -2,0;
- Кальцій хлористий $CaCl_2$ -4,5;
- Магній сірчаноокислий 7-водний $MgSO_4 \times 7H_2O$ -5,8;
- Марганець II хлористий 4-водний $MnCl_2 \times 4H_2O$ -0,04;
- пропінол Б-400-0,014 л.

Готується сольовий розчин та проводиться його гомогенізація. Далі відбувається його стерилізація насиченою парою за температури 120°C,

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						74
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

протягом 30-45 хвилин, за тиску 0,1 МПа. Після цього стерильне середовище охолоджується і зберігається визначений час.

ДР 3.2 Стерилізація не термостабільних компонентів поживного середовища

На вагах зважують наважки розчину глюкози та дезодорованого соєвого борошна у концентрація 6,0 та 8,0 г/дм³ середовища відповідно, і розчиняють в гарячій воді. Відбувається його стерилізація насиченою парою за температури 135°C, протягом 5-10 хвилин, за тиску 0,1 МПа.

ДР 3.3 Змішування і охолодження стерильних розчинів компонентів живильного середовища

Простерилізований розчин термолабільних компонентів перекачується в ферментер, після його стерилізації з термостабільними компонентами середовища – солями (“сольовою подушкою”). Відбувається їх гомогенізація та охолодження до температури культивування 28°C. Значення рН доводять до рівня 7,8-8,2,

ДР 4 Підготовка поживного середовища для біосинтезу

ДР 4.1 Приготування розчинів компонентів поживного середовища

На вагах зважують наважки наступних компонентів, з розрахунку г/дм³ поживного середовища:

- Натрій хлористий NaCl-14,0;
- Калій фосфорнокислий однозаміщений 3-водний K₂HPO₄ × 3H₂O-2,0;
- Магній сірчаноокислий 7-водний MgSO₄ × 7H₂O-5,8;
- Марганець II хлористий 4-водний MnCl₂ × 4H₂O-0,04;

Готується сольовий розчин та проводиться його гомогенізація у ферментері.

На вагах зважують наважки меляси та дезодорованого соєвого борошна у концентрація 20,0 та 7,0 г/дм³ середовища відповідно, і розчиняють в гарячій воді у реакторі.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						75
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 4.2 Змішування і стерилізація поживного середовища

Далі відбувається змішування розчинів компонентів поживного середовища та їх стерилізація насиченою парою за температури 120°C, протягом 30-45 хвилин, за тиску 0,1 МПа. Після цього стерильне середовище охолоджується до температури культивування 28°C і зберігається визначений час.

ДР 5 Підготовка посівного матеріалу

ДР 5.1 Відновлення музейної культури

Відновлення культури продуцента *Streptomyces albus* UN 44, що зберігається та підтримується на агаризованому ПС Гаузе, проводять пересівом на свіже агаризоване середовище та вирощують 7 діб при 28±1 °C.

ДР 5.2 Отримання культури I регенерації

З відновленої культури готують суспензію та засівають у рідке середовище Чапека у колби Ерленмейера місткістю 750 см³ для нарощування посівного матеріалу в режимі: тривалість вирощування 48 годин при 28±1 °C на качалці при 220- 240 хв⁻¹.

ДР 5.3 Отримання культури II регенерації

Приготоване в інокуляторі стерильне поживне середовище охолоджують оборотною водою через рубашку апарату до (28±1)°C та проводять засів посівним матеріалом, що вирощений в колбах в лабораторних умовах (у кількості 5% від об'єму ПС).

- Вирощування посівного матеріалу проводиться протягом 48 год.
- Температура культивування (28±1)°C;

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						76
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Аерація в процесі ферментації: 0,4 л повітря на 1 л середовища за хвилину;
- Перемішування постійне зі швидкістю 220 хв⁻¹.

ТП 6 Виробничий біосинтез

Приготоване в ферментері стерильне поживне середовище охолоджують оборотною водою через рубашку апарату до $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ та проводять засів посівним матеріалом, що вирощений в інокуляторі. Кількість посівного матеріалу – 5% від об'єму поживного середовища. Посівний матеріал передавлюють стиснутим стерильним повітрям $P = 0,3 \text{ МПа}$. Культуру вирощують протягом 96 годин. Режим ферментації:

- Температура $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- Аерація: 0,4 л повітря на 1 л середовища за хвилину;
- Залишковий тиск в апараті 0,05 МПа;
- Перемішування зі швидкістю 220 хв⁻¹;
- $\text{pH} = 6,8-7,2$;
- Коефіцієнт заповнення ферментера – 0,65;

Для мікробіологічного та біохімічного контролю в процесі культивування відбирають наступні проби середовища: після засіву, через кожні 12 годин культивування, кінцева проба.

ТП 7 Відділення біомаси центрифугуванням

Культуральна рідина направляється на центрифугування до центрифуги, протягом 15-20 хв, за 6000 об/хв. Фугат направляється на фасування у бутилі до ПМВ8. Одержана біомаса направляється до іншого підрозділу підприємства для сушіння та пакування. Рідкі та тверді відходи при отриманні посівного матеріалу та культивуванні направляють на ЗВ 10.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						77
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПМВ 8 Пакування, маркування та відвантаження

ПМВ 8 Розлив препарату у бутилі

Отриманий розчин фугату розливають з у пластикові бутилі місткістю по 1 та 5 л. Закручують кришки, та направляють на стадію маркування.

ПМВ 8 Наклеювання етикеток

Наклеюють етикетки з клейкого паперу, що містять наступні дані українською або одночасно українською та іншими мовами:

- назву препарату;
- об'єм;
- номер серії;
- термін придатності;
- умови зберігання;
- країну-виробник та назву підприємства-виробника.

ПМВ 8 Пакування у коробки

Бутилі укладають в коробки, заклеюють клейкою плівкою та укладають до транспортної тари.

ПВ 9 Переробка відходів

Деякі матеріали та речовини можуть бути повторно використані при належній обробці. Відновлення тканинних фільтрів, що використовуються при підготовці води та повітря, відбувається за рахунок вимочування їх в гарячій воді з подальшим чищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

ЗВ 10 Знешкодження відходів та промислових викидів

Регулярне знезараження повітря, конденсату, некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						78
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Некондиційний посівний матеріал чи некондиційна культуральна рідина, піддається термічній обробці гострою парою при температурі більше 120°C протягом 45-60 хвилин, подальшим охолодженням, розбавленням водою та доведенням рН середовища до 7,0 соляною кислотою або розчином натрію їдкого та зливом в загальну каналізаційну систему.

Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів після санітарної обробки виробництва та відпрацьовану воду направляють до збірника нейтралізації стічних вод, де розводять водою до рН на рівні 7,0 за допомогою соляної кислоти або розчином натрію їдкого, та зливають в загальну каналізаційну систему. В цей же збірник зливають промивні води після мийки виробничого ферментера. Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, рукавичок, пакувальних матеріалів утилізуються на міському сміттєзвалищі.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						79
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс складено з розрахунку приготування поживного середовища, посівного матеріалу та отримання продукції за 1 цикл виробництва.

Таблиця 4.4. Матеріальний баланс стадії виробництва

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродукт на	Кількість			Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР4	Вода питна			571	ДР4	Поживне середовище	554,304		
	Соєве борошно	4,2				Втрати	6		
	Меляса	12							
	NaCl	8,4							
	KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	1,2							
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,48							
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,024							
Всього		600,304			Всього		600,304		
ДР5.3	Поживне середовище	35			ДР5.3	Посівний матеріал			35,28
	Посівний матеріал			1,75		Втрати виносом повітря 4%			1,47
Всього		36,75			Всього		36,75		

ТП6	Поживне середовище від ДР4	554,304			ТП6	Культуральна рідина			597,454
	Посівний матеріал ДР5.3			36,75		Втрати з виносом повітря 5%			31,85
						Втрати при перекачуванні			1,75
Всього		631,054			Всього		631,054		
ТП7	Культуральна рідина			597,454	ТП7	Біомаса(15%)	90,5		
						Фугат			500,954
						Втрати при перекачуванні з ферментера -1%			6
Всього		597,454			Всього		597,454		
ПМВ 8	Пластикові бутілі по 5 літрів з кришечками		98		ПМВ 8	Розфасований та упакований готовий препарат в коробки		98 + 98 + 25	490
	Розчин (фугат)			500,95		Втрати ~2%			10,45
	Етикетки		99			Брак		1	
	Коробка		25			Контроль якості			0,5
Всього		722,95			Всього		722,95		

4.5 Контроль виробництва

Контроль виробництва необхідний для отримання якісного продукту, що відповідає зазначеним вимогам та безпеки працівників підприємства. Перелік контрольних точок наведено в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР1.2.1. Приготування розчину миючого засобу Кт1.2.1.1.	Миючий розчин, кількість миючого розчину	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	$C = 5 \%$
ДР1.5.1 Мийка та дезінфекція обладнання та посуду Кт1.5.1.1 Кмб1.5.1.2	Температура, мікробна контамінація	Термометр, мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі	Температура визначаються безперервно під час виробничого процесу	$KYO < 2$ $\tau = 30 \text{ хв}$
ДР1.5.3 Стерилізація обладнання та посуду Кт1.5.3.1 Кмб1.5.3.2	Тиск, температура.	Манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Кожну операцію	$t = 121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 1 \text{ год}$
ДР 2.1. Забір повітря Кт2.1.1	Повітря, що надходить з атмосфери	Пропускна здатність повітрязабірника	Кожну операцію	$[x]=2000$ частинок/м ³
ДР 2.2. Попередня очистка повітря від механічних домішок Кт2.2.1	Ступінь чистоти повітря	Манометр, імпактор	Кожну операцію	$d_{\text{пор}}=5-10 \text{ мкм}$

1	2	3	4	5
ДР2.3 Компресування та транспортуван ня повітря Кт2.3.1	Стиснення повітря	Манометр	Кожну операцію	$P=0,2$ МПа
ДР2.4 Стабілізація термодинамічн их показників повітря Кт2.4.1	Температура, вологість	Термометр, психрометр	Кожну операцію	$t = 20$ °С $W=60\%$
ДР2.5 Очищення повітря на головному фільтрі Кт2.5.1 Кмб2.5.2	Повітря, вміст часток та мікроорганіз мів	Мікробіологіч ний метод (висів на чашки Петрі), Седиментацій ний метод	2 рази на тиждень, під час виробничог о біосинтезу	Відсутність життєздатних м/о, часток в 1м^3 повітря до 200. $E = 90 \%$
ДР2.6 Очищення повітря на індивідуально му фільтрі Кт2.6.1 Кмб2.6.2	Вміст часток та мікроорганіз мів	Часточки бруду; манометр	Безперервн о при подачі повітря	$E = 99,99 \%$
ДР3.1 Стерилізація термостабільн их компонентів Кт3.1.1	Час, температура, тиск	Годинник, манометр технічний, термометр, термоіндикато р	Постійно під час процесу	$t = 120$ °С, $\tau = 30$ хв, $P = 0,1$ МПа
ДР3.2 Стерилізація термолабільних компонентів Кт3.2.1	Час, температура, тиск	Годинник, манометр технічний, термометр, термоіндикато р	Постійно під час процесу	$t = 135$ °С, $\tau = 5-10$ хв, $P = 0,1$ МПа

1	2	3	4	5
ДР3.3 Змішування і охолодження стерильних розчинів компонентів живильного середовища Кт3.3.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$,
ДР4.1 Стерилізація термостабільних компонентів Кт4.1.1	Час, температура, тиск	Годинник, манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Постійно під час процесу	$t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, $P = 0,1\text{ МПа}$
ДР4.2 Стерилізація термолабільних компонентів Кт4.2.1	Час, температура, тиск	Годинник, манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Постійно під час процесу	$t = 135\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 5-10\text{ хв}$, $P = 0,1\text{ МПа}$
ДР4.3 Змішування і охолодження стерильних розчинів компонентів ПС Кт4.4.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$,
ДР5.1 Відновлення музейної культури Кт5.1.1 Км65.1.2	Фізіолого- морфологічн ий стан культури, температура	Мікроскопіюван ня, Мікробіологі- чна чистота	Кожну операцію	$t = 28 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
ДР5.2 Отримання культури І генерації в колбах Кт5.2.1 Км65.2.2 Кх5.2.3	Температура, рН, відсутність контамінації	Термометр, рН- метр, мікроскоп	Кожну операцію	$t = 28 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 6,5 \pm 1$

1	2	3	4	5
ДР5.3 Отримання культури II генерації в інокуляторі Кт5.2.1 Км65.2.2 Кх5.2.3	Температура, рН, відсутність контамінації	Термометр, рН- метр, мікроскоп	Кожну операцію	$t = 28 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,8-7,2$
ТП6 Виробничий біосинтез Кт6.1 Км66.2 Кх6.3	Температура, рН, відсутність контамінації, аерація	Термометр, рН- метр	Кожну операцію	$t = 28 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,8-7,2$ $\tau = 96 \text{ год}$,
ТП7 Відділення фугату центрифугуванн ям Кт7.1	Швидкість осадження клітин, Час осадження клітин	Табло центрифуги, візуально, годинник	Кожну операцію	$\tau = 15-20 \text{ хв}$, $n = 6000$ об/хв
ПМВ8 Пакування, маркування, відвантаження готової продукції	Бутилi з продуктом, точність розливу, якість упаковки	Ваги, візуально	Вибірково	$V = 1(5) \text{ л}$ Якісний друк, етикетка, чиста тара ззовні

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва представлена на листі формату А1.

Шифр креслення: ДП 6119. 01.000 ТК

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						85
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Висновки до розділу №4

- Наведена характеристика кінцевої продукції виробництва – стимулятора росту рослин у бутелях місткістю 1 та 5 літрів, з терміном зберігання 12 місяців при належних умовах зберігання.
- Складена таблиця з характеристиками сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві. Наведені нормативні документи та показники яким вони мають відповідати.
- Розроблений опис технологічного процесу, що охоплює усі стадії виробництва, від допоміжних робіт до переробки і знешкодження відходів.
- Розрахований матеріальний баланс виробництва, відповідно якого за 1 цикл роботи ферментера об'ємом 1 м³ виробляється 98 п'яти літрових бутелів препарату.
- Запропонований контроль виробництва по стадіям, з визначеними методами контролю та періодичністю перевірки.
- Складена технологічна схема виробництва.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						86
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Виробниче культивування культури мікроорганізмів *Streptomyces albus* UN44 при виробництві препарату стимулятора росту рослин відбувається глибинним способом у ферментері.

Оптимальними умовами для вирощування штаму-продуценту препарату стимулятора росту рослин є виконання наступних вимог:

- Температура вирощування мікробної культури 28 ± 1 °C ;
- Перемішування зі швидкістю 220 хв^{-1} ;
- Аерація: 0,4 л повітря на 1 л середовища за хвилину;
- Залишковий тиск в апараті 0,05 МПа;
- Герметичність посівного апарату.

В залежності від методів роботи ферментери для глибинного культивування мікроорганізмів поділяються на групи:

- за способом культивування – на апарати безперервної та періодичної дії;
- за стерильністю – на герметичні апарати та ті, що не потребують асептичності
- за конструктивними ознаками – на ферментери з дифузором та турбіною, з механічними мішалками, рухомими аераторами, зовнішнім циркуляційним контуром;
- за способом введення енергії – на апарати з введенням енергії за допомогою газової фази, рідкої фази та комбіновані [64].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Чорний С. І.						
Перевір.		Карпенко Ю.В.					87	112
Керівн.		Карпенко Ю.В.				НТУУ “КПІ” ФБТ		
Затверд.								

Перемішування - основний енерговитратний процес, що відбувається у ферментері та забезпечує процес перенесення компонентів багатофазної системи. Перемішування аеробних процесів відбувається одним з 3 способів введення енергії в культуральну рідину:

- ✓ стисненим газом (пневматичне перемішування);
- ✓ за допомогою механічних перемішувачів пристроїв;
- ✓ за допомогою енергії рідкої фази [65].

Виходячи з вимог, щодо культивування даного продуценту обираємо ферментер з механічним перемішувачем пристроєм.

Ферментери в які введення енергії здійснюється механічними перемішувачами пристроями можна класифікувати за особливостями конструкції як самого реактора так і за особливостями мішалок.

В промислових ферментерах зазвичай використовують механічні мішалки з обертальним рухом. Під час роботи таких мішалок виникає складний тривимірний рух рідини – тангенціальний, радіальний та осьовий. Перемішування рідкої фази забезпечується за рахунок вихорів, що виникають на краях мішалки.

Мішалки можуть бути розділені на такі основні групи:

- ✓ лопатеві,
- ✓ якірні,
- ✓ рамні,
- ✓ пропелерні,
- ✓ турбінні.

Для даного процесу найбільш оптимальною мішалкою є лопатева, що зазвичай використовується для перемішування взаєморозчинних рідин, змішування твердих і волокнистих часток у рідині, змішування легких осадів, повільного розчинення кристалічних і волокнистих речовин [66, 67].

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						88
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У якості ферментеру обраний апарат з еліптичними днищем і кришкою. Перемішуючим пристроєм, як було сказано, обрана лопатева мішалка, яка забезпечує необхідну інтенсивність перемішування без шкідливого впливу на культуру, що вирощується.

Приведення в рух лопатевої мішалки відбувається за допомогою приводу, з електроенергією в якості рухомої сили. Для забезпечення асептичності біосинтезу в якості герметизуючого пристрою валів, що обертаються використовують торцеві ущільнення з паровим захистом [66].

На кришці апарату передбачено декілька штуцерів: для входу/виходу повітря, подачі миючих засобів, завантаження посівного матеріалу та сировини, а також смотровий люк та люк пробовідбірника.

На днищі корпусу розташовано штуцер для зливу розчину по закінченню процесу. Ще 4 штуцери розміщені на рубашці: для входу і виходу гарячого теплоносія – насиченої пари, та холодного теплоносія – оборотної води [64-66].

Для підтримання асептичності процесу апарат перед роботою стерилізують паром під тиском за рахунок підведення теплоносія у сорочку ферментера.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						89
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2. Технологічні, конструктивні розрахунки

Апарат призначений для культивування бактерій *S. albus*

1. Номінальний об'єм апарата, м ³	1;
2. Коефіцієнт заповнення	0,65;
3. Площа поверхні теплообміну рубашки, м ²	2,8;
4. Тиск, МПа:	
в апараті	0,05;
в сорочці	0,1;
5. Температура, °С	
робочого середовища	28;
6. Тип перемішуючого пристрою – лопатева мішалка	
кількість мішалок	1;
частота обертання валу мішалки, с ⁻¹	3,67;
потужність приводу, кВт	3;
7. Габаритні розміри:	
- довжина	2400 мм;
- ширина	1440 мм;
- висота	1440 мм;
8. Маса	705 кг.

Розрахунок ферментеру для культивування культури продуцента препарату стимулятора росту рослин.

Вихідні дані:

- об'єм апарату – $V=1 \text{ м}^3$;
- ступінь заповнення – $\phi=0,65$;
- температура в апараті підтримується на рівні $T=28 \text{ °С}$;
- витрати повітря – $15,6 \text{ м}^3/\text{год}$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2.1. Визначення теплофізичних властивостей середовища, що переміщується

Розрахунок теплофізичних властивостей поживного середовища за температури – $T=28^{\circ}\text{C}$ [67,68].

Густина поживного середовища, основою якого є м'яса розраховують за рівнянням:

$$\rho = 1007,3 + 4,11(CP - 0,11t) \quad (5.1)$$

$$\rho = 1007,3 + 4,11(4 - 0,11 \cdot 28) = 1011,1 \text{ кг/м}^3$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища:

$$\mu_c = (2,7 + 0,192 \cdot CB) \cdot t_c^{-m} \cdot 10^{-3}; \quad (5.2)$$

де при СВ до 15%, $m = 0,426$.

$$\mu_c = (2,7 + 0,192 \cdot 4) \cdot 28^{-0,426} \cdot 10^{-3} = 0,83 \cdot 10^{-3} (\text{Па} \cdot \text{с}).$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості поживного середовища:

$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c}; \quad (5.3)$$

$$\nu_c = \frac{0,83 \cdot 10^{-3}}{1011,1} = 0,82 \cdot 10^{-6} (\text{м}^2/\text{с}).$$

Теплоємність поживного середовища:

$$c_c = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot CB - t_c); \quad (5.4)$$

$$c_c = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 4 - 28) = 4,033 (\text{кДж/кг} \cdot \text{К})$$

Коефіцієнт теплопровідності поживного середовища:

$$\lambda_c = 0,5646 \cdot t_c^{0,0879} \cdot CB^{-0,195}; \quad (5.5)$$

$$\lambda_c = 0,5646 \cdot 28^{0,0879} \cdot 4^{-0,195} = 0,577 (\text{Вт/м} \cdot \text{К}).$$

5.2.2. Конструктивний розрахунок ферментеру

Робочий об'єм апарату обчислюється за формулою:

$$V_p = V_n \cdot K_3; \quad (5.6)$$

$$V_p = 1 \cdot 0,65 = 0,65 \text{ (м}^3\text{)}.$$

Обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). За ГОСТ 20680–86 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Общие технические требования» внутрішній діаметр апарату складає [69]:

$$D_{\text{вн}} = 1000 \text{ мм} = 1 \text{ м}.$$

$$\text{Висота корпусу } H = 1450 \text{ мм} = 1,45 \text{ м}.$$

Розрахунок днища апарату. Висота еліптичної частини днища ферментеру визначають за формулою:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}}; \quad (5.7)$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 1000 = 250 \text{ (мм)} = 0,25 \text{ м}.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533-78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов. Основные размеры» обираємо решту конструктивних розмірів днища апарату [70]:

$$h_{\text{о.дн}} = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м} \text{ – висота основи еліптичного днища};$$

$$S_{\text{дн}} = 4 \text{ мм} = 0,005 \text{ м} \text{ – товщина стінки еліптичного днища};$$

$$F_{\text{вн.дн}} = 1,21 \text{ м}^2 \text{ – внутрішня поверхня еліптичного днища};$$

$$V_{\text{дн}} = 251,1 \text{ дм}^3 = 0,2511 \text{ м}^3 \text{ – об'єм еліптичного днища}.$$

$$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел.дн}} + h_{\text{о.дн}} = 0,25 + 0,04 = 0,254 \text{ (м)} \text{ – повна висота днища}.$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						92
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Повний об'єм ферментера:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}}; \quad (5.8)$$

звідки об'єм циліндричної частини складає:

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 1 - 2 \cdot 0,254 = 0,492 \text{ (м}^3\text{)}.$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2}; \quad (5.9)$$

$$H_{\text{ц}} = \frac{0,492 \cdot 4}{3,14 \cdot 1^2} = 0,63 \text{ (м)}.$$

Розрахунок перемішуючого пристрою – лопатевої мішалки.

Діаметр перемішуючого пристрою становитиме:

$$\frac{D}{d_{\text{м}}} = 1,4 \div 1,7; \quad (5.10)$$

$$d_{\text{м}} = \frac{D}{1,6} = \frac{1}{1,6} = 0,625 \text{ м}.$$

Зі стандартного ряду обираємо мішалку діаметром

$$d_{\text{м}} = 630 \text{ мм} = 0,63 \text{ м}.$$

Розрахуємо геометричні розміри мішалки. Висота перемішуючого пристрою:

$$h_{\text{м}} = d_{\text{м}} \cdot 0,1 = 630 \cdot 0,1 = 63 \text{ (мм)} = 0,063 \text{ м}.$$

Висота розміщення перемішуючого пристрою над днищем апарату:

$$h = d_{\text{м}} \cdot 0,5 = 315 \text{ мм} = 0,315 \text{ м}.$$

Товщина відбивної перегородки:

$$b = d_{\text{м}} \cdot 0,1 = 630 \cdot 0,1 = 63 \text{ (мм)} = 0,063 \text{ м}.$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						93
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Висоту рівня рідини в апараті обчислюється за формулою:

$$H_p = \frac{4V_p}{\pi D} + h_{дн}; \quad (5.16)$$

$$H_p = \frac{4 \cdot 0,65}{3,14 \cdot 1} + 0,254 = 1,082 \text{ (м)}.$$

Розрахунок глибини воронки

Для лопатевої мішалки швидкість перемішуючого пристрою становить:
 $n=220 \text{ об/хв} = 3,67 \text{ с}^{-1}$.

Параметр висоти завантаження γ апарата визначають за формулою:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1; \quad (5.18)$$

$$\gamma = 8 \cdot \frac{1,082}{1} + 1 = 9,656.$$

Параметр гідравлічного опору мішалки E знаходять за формулою:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re_{ц}^{0,25}}; \quad (5.19)$$

де ξ_M – коефіцієнт гідравлічного опору мішалки, що складає 0,85 для лопатевої мішалки;

z_M – кількість мішалок на одному валу.

Критерій Рейнольдця:

$$Re_{цб} = \frac{nd_M^2}{\nu_p} = \frac{3,67 \cdot 0,63^2}{0,82 \cdot 10^{-6}} = 1,78 \cdot 10^6,$$

де n – число обертів мішалки с^{-1}

$$E = \frac{9,656}{0,85 \cdot 1 \cdot (1,78 \cdot 10^6)^{0,25}} = 0,311.$$

За значенням параметру E знаходимо параметр розподілення швидкості ψ_1 .

$$\psi_1 = 0,5.$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						94
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

За значенням параметру ψ_1 знаходять параметр глибини воронки B .

$$B = 8.$$

Глибину воронки знаходимо за формулою:

$$h_B = \frac{B n^2 d_M^2}{2}; \quad (5.20)$$

$$h_B = \frac{8 \cdot 3,67^2 \cdot 0,63^2}{2} = 21,4 \text{ (м)}.$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{гр} = H_p - h; \quad (5.21)$$

$$h_{гр} = 1,082 - 0,315 = 0,34 \text{ (м)}.$$

Оскільки $h_B > h_{гр}$ – в реакторі, необхідно встановити перегородки.

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначають за формулою:

$$N_M = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_M^5; \quad (5.23)$$

де K_N – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса:

$$Re_{ц} = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_M^2}{\mu_c}; \quad (5.24)$$

$$Re_{ц} = \frac{1011,1 \cdot 3,67 \cdot 0,63^2}{0,83 \cdot 10^{-3}} = 1,774 \cdot 10^6.$$

За графіком нормалі знаходимо значення $K_N = f(Re_{ц})$:

$$K_N = 0,6.$$

Тоді за (5.23) потужність, що споживається, становить:

$$N_M = 0,6 \cdot 1011,1 \cdot 3,67^3 \cdot 0,63^5 = 2976 \text{ (Вт)} = 3 \text{ кВт}$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						95
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2.3. Тепловий розрахунок

Надходження енергії у посівний апарат відбувається:

1) з поживним середовищем:

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{с}} \cdot C_{\text{с}} \cdot t_{\text{с}} = \rho_{\text{с}} \cdot V_{\text{р}} \cdot 0,9 \cdot C_{\text{с}} \cdot t_{\text{с}}; \quad (5.25)$$

$$E_{\text{пс}} = 1011,1 \cdot 0,6 \cdot 0,9 \cdot 4033 \cdot 28 = 61655,8 \text{ (кДж)}$$

2) з посівним матеріалом:

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot 0,1 \cdot V_{\text{р}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}}; \quad (5.26)$$

де $C_{\text{пм}} = 3900 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – орієнтовна питома теплоємність посівного матеріалу[71],

$t_{\text{пм}} = 28^{\circ}\text{C}$ – температура посівного матеріалу,

$\rho_{\text{пм}} = 1040 \text{ кг/м}^3$ – орієнтовна густина посівного матеріалу[71],

$$E_{\text{пм}} = 1040 \cdot 0,1 \cdot 0,05 \cdot 3900 \cdot 28 = 567,8 \text{ (кДж)}.$$

3) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_1} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}}; \quad (5.27)$$

де $\rho_{\text{пов}} = 1,17 \text{ кг/м}^3$ – густина повітря при температурі 28°C [71],

$C_{\text{пов}} = 1005 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність повітря[71],

$t_{\text{пов}} = 28^{\circ}\text{C}$ – початкова температура повітря,

$\tau_{\text{пр}} = 96 \text{ год} = 345600 \text{ с}$ – тривалість процесу культивування,

$V_{\text{г}} = 0,00433 \text{ м}^3/\text{с}$ – витрати повітря,

$$E_{\text{пов}_1} = 1,17 \cdot 0,0043 \cdot 345600 \cdot 1005 \cdot 28 = 48927 \text{ (кДж)}.$$

4) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{\text{дис}_1} = N_{\text{м}} \cdot \tau_{\text{пр}}; \quad (5.28)$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						96
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$E_{\text{дис}_1} = 2976 \cdot 345600 = 1\,028\,537 \text{ (кДж)}$$

Загальна кількість надходжень теплоти до ферментеру:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов}} + E_{\text{дис}_1}; \quad (5.29)$$

$$\begin{aligned} \sum E_{\text{надх}} &= 61655,8 + 567,8 + 48\,927 + 1\,028\,537 = 1\,139\,688 \text{ (кДж)} \\ &= 1\,340 \text{ (МДж)}. \end{aligned}$$

Витрати теплової енергії здійснюються:

1) з культуральною рідиною:

$$E_{\text{к}} = M_{\text{к}} \cdot C_{\text{к}} \cdot t_{\text{к}} = \rho_{\text{к}} \cdot V_{\text{р}} \cdot C_{\text{к}} \cdot t_{\text{к}}; \quad (5.30)$$

де $C_{\text{к}} = 4000 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – орієнтовне значення питомої теплоємності культуральної рідини [71],

$t_{\text{к}} = 28^\circ\text{C}$ – температура культуральної рідини,

$\rho_{\text{к}} = 1010 \text{ кг/м}^3$ – орієнтовне значення густини культуральної рідини [71],

$$E_{\text{к}} = 1010 \cdot 0,65 \cdot 4000 \cdot 28 = 73,528 \text{ (МДж)}.$$

2) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_2} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{с}} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{с}}; \quad (5.31)$$

$$E_{\text{пов}_2} = 1,17 \cdot 0,0043 \cdot 345600 \cdot 1005 \cdot 28 = 51,02 \text{ (МДж)}.$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_{\text{к}} + E_{\text{пов}_2}); \quad (5.32)$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (73,528 + 51,02) = 2,49 \text{ (МДж)}.$$

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{\text{витрат}} = E_{\text{к}} + E_{\text{пов}_2} + E_{\text{втр}}; \quad (5.33)$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						97
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\sum E_{\text{витрат}} = 73,528 + 51,02 + 2,49 = 127,04 \text{ (МДж)}.$$

Теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_T = \sum E_{\text{витрат}} - \sum E_{\text{надх}}; \quad (5.34)$$

$$E_T = 127,04 - 1139,7 = -1012,66 \text{ (МДж)}.$$

Отже, у апараті відбувається нагрівання, та для підтримання температури культивування необхідно його охолоджувати.

$$Q = |E_m| = 1012,66 \text{ МДж}.$$

$$Q = M_m \cdot C_m \cdot (t_{mn} - t_{mk}). \quad (5.35)$$

Згідно з (5.35):

$$M_m = \frac{Q}{C_m \cdot \Delta t_m};$$

де $C_m = 4200 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_m = 2^\circ\text{C}$ – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія,

$$M_m = \frac{1012,66 \cdot 10^6}{4200 \cdot 2} = 120\,554,8 \text{ (кг)}.$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_m = \frac{M_m}{\tau_{np}}; \quad (5.36)$$

$$G_m = \frac{1012,66}{345600} = 0,00293 \text{ (кг/с)}.$$

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія. Оскільки у ферментері відбувається процес нагрівання, то:

Приймаємо $\Delta t_{cp} = 10^\circ\text{C}$. Тоді:

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						98
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$t_m = 28 - 10 = 18^{\circ}\text{C};$$

$$t_{mn} = 19^{\circ}\text{C};$$

$$t_{mk} = 17^{\circ}\text{C}.$$

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знайти коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у апараті, та коефіцієнт теплопередачі.

Для розрахунку коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки визначаємо:

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \cdot Fr^{-0,1} \quad (5.37)$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{d_m}{\nu_c} (nd_m + 4W_r); \quad (5.38)$$

$$W_r = \frac{4V_r}{\pi D^2}; \quad (5.39)$$

$$W_r = \frac{4 \cdot 0,00433}{3,14 \cdot 1^2} = 0,00552 \text{ (м/с)}.$$

Тоді:

$$Re_c = \frac{0,63}{0,82 \cdot 10^{-6}} (5 \cdot 0,63 + 4 \cdot 0,00552) = 2,44 \cdot 10^6.$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c}; \quad (5.40)$$

$$Pr_c = \frac{0,83 \cdot 10^{-3} \cdot 4033}{0,577} = 5,8.$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						99
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{n^2 d_M}{g};$$

$$Fr_c = \frac{3,67^2 \cdot 0,63}{9,81} = 0,865.$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (2,44 \cdot 10^6)^{0,59} \cdot 5,8^{0,38} \cdot 0,865^{-0,1} = 1,35 \cdot 5868,9 \cdot 1,95 \cdot 1,014 = 15\,675,6.$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D}; \quad (5.41)$$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарату до води

$$\alpha_T = \frac{Nu_T \cdot \lambda}{H_p} \quad (5.42)$$

$$\alpha_c = \frac{15\,675,6 \cdot 0,577}{1,1} = 8222,6 \text{ (Вт/м}^2 \cdot \text{К)}.$$

$$\text{де } Nu_T = C \cdot (Gr \cdot Pr)^a \quad (5.43)$$

$$Gr \cdot Pr = H_{руб.}^3 (t_{ст} - \theta_{ср}) \cdot B = 1,1^3 (28 - 18) \cdot 14,2 \cdot 10^9 = 1,89 \cdot 10^{11}$$

де коефіцієнт B залежності від $\theta_{ср} = 14,2 \cdot 10^9$

Висоту рубашки приймаємо рівній висоті рівня рідини. Оскільки добуток $Gr \cdot Pr > 10^9$, то коефіцієнти у формулі для визначення критерію Нуссельта мають такі значення: $C = 0,76$, $a = 0,25$, а отже

$$Nu_T = 0,76 \cdot (1,89 \cdot 10^{11})^{0,25} = 501,1$$

$$\alpha_T = \frac{501,1 \cdot 0,577}{1,1} = 262,85 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_T}} \quad (5.44)$$

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						100
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

де $\lambda_{cm} = 16 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$ – теплопровідність стінки

$$K = \frac{1}{\frac{1}{15675,6} + \frac{0,004}{16} + \frac{1}{262,85}} = \frac{1}{0,0063972} = 242,82 (\text{Вт/м}^2 \cdot \text{К}).$$

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau_{np}} \quad (5.45)$$

$$F_p = \frac{1012,66 \cdot 10^6}{242,82 \cdot 10 \cdot 345600} = 1,21 (\text{м}^2)$$

Дійсна поверхня теплообміну складає $2,8 \text{ м}^2$, отже умова теплообміну виконується, оскільки: $F_p < F_{\delta}$.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Основним загальнозаводським обладнанням для ділянки біосинтезу продукту є насоси для заповнення ферментеру, закачування води та перекачування середовища з культурою, тощо. Використовувати необхідно насоси, які забезпечать стерильність процесу, а також забезпечать швидку та ефективну подачу поживного середовища з культурою, та унеможливають потрапляння викидів у навколишнє середовище. Для цього був обраний центробіжний герметичний електронасос SPRUT MRS 5, ДСТУ 6134-2009.

Для відбору проб можна використовувати малогабаритні перистальтичні насоси, що забезпечують асептичність перекачування. До того ж, рідина контактує лише з інертними матеріалами і не впливає на механічну частину насоса [72].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Охорона навколишнього середовища.

Екологічна безпечність виробництва забезпечується відповідним виробничим обладнанням та комунікаціями, що не допускають виділення шкідливих речовин у місця робочої зони в кількостях, що перевищують гранично допустимі концентрації при нормальному веденні технологічного

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						101
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

процесу, а також правильну експлуатацію санітарно-технічного обладнання та пристроїв; нейтралізацією відходів виробництва, промивних і стічних вод;

Кількість технологічних та вентиляційних викидів в атмосферу на даному підприємстві є незначним і не забруднює навколишнє середовище.

Охорона праці

Для створення безпечних умов праці робітників підприємства передбачені засоби індивідуального захисту від небезпечних та шкідливих факторів [73]. Регулярними є тренінги та перевірки знань персоналу з питань охорони праці та надання першої медичної допомоги.

Для зменшення шкідливих виробничих факторів передбачено:

1. Технологічний процес має відбуватися лише за належного та працездатного стану обладнання підприємства;
2. Робочі місця мають бути забезпечені необхідними засобами індивідуального захисту та аптечками першої медичної допомоги;
3. Обладнання з електроприводом та силове електрообладнання повинно мати заземлення;

Висновки до розділу №5

- Обрано ферментер для періодичного глибинного культивування, об'ємом 1000л з лопатевою мішалкою для перемішування та барботером для аерації культури.
- Наведений конструктивний розрахунок ферментеру, в якому визначено основні розміри, діаметри лопатевої мішалки, що складає 0,8 м. Розрахована глибина воронки від перемішування та встановлена необхідність застосування відбивної перегородки. Визначена потужність, що використовується на перемішування і складає близько 1,5 кВт.
- Складений тепловий розрахунок процесу, що показує переважання надходження енергії до ферментеру на близько 500 МВт, що свідчить про нагрівання апарату і необхідності його охолодження.
- Вибрано загальнозаводське обладнання для ділянки біосинтезу, а саме центробіжні електронасоси для перекачування середовища з культурою, та перистальтичні насоси для відбору проб.
- Уточнено вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ	Арк.
						103
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва препарату стимулятора росту рослин обрано продуцент *Streptomyces albus* UN44, що синтезує значну кількість фітогормонів та гідролітичних ферментів із літичною активністю 1200 од/мл у фугаті культуральної рідини.
2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів та обрано схему отримання продуценту шляхом двоступінчастої послідовної обробки мутагенами у встановлених ефективних дозах: нітратною кислотою (0,5 М HNO_3 , 50 хв.) і ультрафіолетовим випромінюванням (240 Дж/м²).
3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Streptomyces albus* UN44 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі меляси та соєвого борошна, а також визначені раціональні параметри культивування: температура $28 \pm 1^\circ\text{C}$, перемішування при 220 об/хв, тривалість 96 год, аерація $0,4 V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}} \times \text{хв}$.
4. Визначені біохімічні характеристики компонентів кінцевого продукту та механізми їх впливу на біохімічні процеси. Встановлена відсутність необхідності додаткового очищення продукту.
5. Запропоновано, розраховано та накреслено конструкцію апарату для проведення виробничого біосинтезу продукту. Обрано біореактор з мішалкою, об'ємом 1 м³.
6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва препарату стимулятора росту рослин для агропромисловості в бутелях по 5 л.

					ДП 6119. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Чорний С. І.			Висновки		Літ.	Арк.
Перевір.		Карпенко Ю.В.						112
Керівн.		Карпенко Ю.В.					НТУУ “КПІ” ФБТ	
Затверд.								